



Université de Sherbrooke

**Le rôle d'IGFBP2 dans la dysfonction podocytaire et le développement de la  
néphropathie diabétique**

Par  
David-Alexandre Dancosst  
Programme de Physiologie

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la  
santé en vue de l'obtention du grade de maitre ès sciences  
(M.Sc.) en Physiologie

Sherbrooke, Québec, Canada  
Mars, 2021

Membres du jury d'évaluation  
Pedro Geraldès, programme de physiologie  
Anne-Marie Côté, programme de physiologie  
Steve Jean, programme d'immunologie et de biologie cellulaire

© David-Alexandre Dancosst

## RÉSUMÉ

### **Le rôle d'IGFBP2 dans la dysfonction podocytaire et le développement de la néphropathie diabétique**

Par

David-Alexandre Dancosst  
Programmes de physiologie

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé en vue de l'obtention du diplôme de maître ès sciences (M.Sc.) en physiologie, Faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4

La néphropathie diabétique (ND) est la première cause d'insuffisance rénale de stade terminale en Amérique du Nord. Les podocytes sont primordiaux aux mécanismes de filtration glomérulaire. Plusieurs études ont montré que leur apoptose corrèle fortement avec la progression de la ND. Les podocytes sont une cible pour l'insulin-like growth factor (IGF), un facteur important pour l'intégrité des cellules. Des anomalies dans la signalisation de l'IGF sont associées avec une dysfonction podocytaire. La protéine IGFBP2 est connue pour interagir avec l'IGF et limiter ses actions et pour des mécanismes indépendants de l'IGF. Notre collaborateur a montré que les niveaux circulants d'IGFBP2 étaient réduits d'environ 33% chez des adolescents obèses diabétiques de type 2 comparés à des adolescents obèses contrôles. Cette baisse corrèle avec une augmentation de la microalbuminurie et d'autres marqueurs inflammatoires. Le rôle d'IGFBP2 dans le développement de la ND étant encore inconnu, nos objectifs sont de caractériser l'expression d'IGFBP2 dans la signalisation de l'IGF dans des podocytes exposés à des concentrations élevées de glucose (HG) et/ou en présence d'acides gras saturés (palmitate) et d'étudier le rôle d'IGFBP2 dans le développement de la ND dans un modèle murin de diabète de type 1 surexprimant ou déficient pour IGFBP2. Des podocytes stimulés avec IGF-2 montre une activation des voies d'Akt et ERK1/2 alors que le palmitate réduit cette activation. L'hyperglycémie active plus faiblement ces voies avec une stimulation à l'IGF-2 et un traitement au palmitate. L'utilisation d'un recombinant d'IGFBP2 montre que les podocytes ont une activation basale de ERK1/2 sans IGF, alors qu'une stimulation avec l'IGF-2 en présence du recombinant montre une absence d'activation pour Akt et IGF1R $\beta$ . Le palmitate empêche l'activation de ERK1/2 dans toutes les conditions, alors qu'il ne réduit pas fortement l'activation d'Akt et favorise la phosphorylation d'IGF1R $\beta$  stimulés à l'IGF-2. Des souris diabétiques Akita surexprimant IGFBP2 présentent une pression artérielle diminuée, une aire mésangiale plus faible, une augmentation des niveaux plasmatiques et glomérulaires d'IGFBP2 et une activation de p-Akt plus importante que des souris diabétiques. Des souris Akita avec délétion d'IGFBP2 ont un poids et une activation d'Akt plus élevés et des aires glomérulaires, des aires mésangiales, une albuminurie et un débit de filtration glomérulaire (GFR) plus faibles que les souris diabétiques. En conclusion, un excès ou une perte totale d'IGFBP2 causent des effets néfastes participant au développement de la ND. Un bon contrôle de l'expression de cette protéine pourrait aider à réduire le développement de la ND. Mots clés : Néphropathie diabétique, IGFBP2, podocytes, IGF

## SUMMARY

### **Role of IGFBP2 on podocyte dysfunction and diabetic nephropathy**

By

David-Alexandre Dancosst

Physiology Program

Thesis presented at the Faculty of medicine and health sciences for the obtention of Master degree diploma maitre ès sciences (M.Sc.) in Physiology, Faculty of medicine and health sciences, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4

Diabetic nephropathy (DN) is the leading cause of end-stage renal disease in North America. Podocytes are essential for glomerular filtration mechanisms. Several studies have shown that their apoptosis correlates strongly with the progression of DN. Podocytes are a target for insulin-like growth factor (IGF), an important growth factor for the integrity of cells. Abnormalities in IGF signaling are associated with podocyte dysfunction. The IGFBP2 protein is known to interact with IGF by limiting its actions as well as for IGF-independent actions. Results from our collaborator showed that circulating levels of IGFBP2 were reduced by approximately 33% in type 2 diabetic obese adolescents compared to obese but normoglycemic controls. This reduction was correlated with microalbuminuria and other inflammatory markers. Since the role of IGFBP2 in the development of DN is still unknown, our objectives are to characterize the expression of IGFBP2 in the IGF signaling pathway in podocytes exposed to high glucose concentrations (HG) and/or with saturated fatty acids (palmitate) and to study the role of IGFBP2 in the development of DN in both IGFBP2-deficient or overexpressing mice with type 1 diabetes (Akita). Podocytes stimulated with IGF-2 show an increase in the phosphorylation of Akt and ERK1/2 while palmitate reduces this activation. Hyperglycemia weakly activates these pathways in the presence of IGF-2 and palmitate. Using a recombinant IGFBP2 shows that podocytes activate ERK1/2 protein without IGF, whereas stimulation with IGF-2 and recombinant IGFBP2 shows no activation for Akt and IGF1R $\beta$ . Palmitate prevents activation of ERK1/2 under all conditions but does not reduce Akt phosphorylation and even promotes activation of IGF1R $\beta$  in the presence of IGF-2. Diabetic Akita mice overexpressing IGFBP2 exhibit decreased blood pressure, lower mesangial area, increased plasmatic and glomerular levels of IGFBP2 and a greater activation of Akt than diabetic mice. On the opposite, IGFBP2-deficient Akita mice have higher weight and Akt activation as well as lower glomerular areas, mesangial areas, albuminuria and glomerular filtration rate (GFR) than diabetic mice. In conclusion, excess or complete loss of IGFBP2 causes adverse effects participating in the progression of DN. Controlling the expression of IGFBP2 could help reduce the development of DN.

Keywords : Diabetic nephropathy, IGFBP2, podocytes, IGF

## TABLE DES MATIÈRES

<b>Résumé.....</b>	<b>iii</b>
<b>Summary .....</b>	<b>iv</b>
<b>Table des matières.....</b>	<b>v</b>
<b>Liste des figures .....</b>	<b>ix</b>
<b>Liste des tableaux.....</b>	<b>x</b>
<b>Liste des abréviations.....</b>	<b>xi</b>
<b>Introduction .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Le diabète.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Types de diabète .....</b>	<b>2</b>
1.2.1 Diabète de type 1 .....	2
1.2.2 Diabète de type 2 .....	3
1.2.3 Les autres types de diabète .....	4
1.2.3.1 Diabète gestationnel .....	5
1.2.3.2 Diabète auto immunitaire latent chez l'adulte .....	5
1.2.3.3 Formes monogéniques du diabète.....	6
<b>1.3 Les complications vasculaires.....</b>	<b>6</b>
1.3.1 Athérosclérose .....	7
1.3.2 La maladie des artères périphériques.....	8
1.3.3 La rétinopathie diabétique.....	9
1.3.4 La neuropathie diabétique.....	10
1.3.5 La néphropathie diabétique .....	11
<b>1.4 Physiologie du rein .....</b>	<b>12</b>
1.4.1 Les tubules.....	13
1.4.1.1 Tubule contourné proximal .....	14
1.4.1.2 Anse du néphron .....	15
1.4.1.3 Tubule contourné distal .....	15
1.4.1.4 Tubule rénal collecteur.....	16
1.4.2 Le glomérule .....	16
1.4.2.1 L'endothélium .....	17
1.4.2.2 Le mésangium.....	18
1.4.2.3 Les podocytes .....	18
1.4.3 Les fentes de filtration .....	19

<b>1.5 Facteurs de dysfonction podocytaire .....</b>	<b>20</b>
1.5.1 Les produits de glycation avancée.....	21
1.5.2 Le stress oxydatif.....	21
1.5.3 Les protéines kinases C .....	22
1.5.4 Néphrine .....	22
1.5.5 Hormones et facteurs de croissance .....	23
1.5.5.1 Angiotensine II.....	23
1.5.5.2 VEGF .....	24
1.5.5.3 L'insuline.....	25
1.5.5.4 L'insulin-like growth factor .....	26
<b>1.6 Signalisation de l'IGF .....</b>	<b>26</b>
1.6.1 Les propriétés de l'IGF.....	27
1.6.2 Récepteurs à l'IGF et sa signalisation .....	28
<b>1.7 Les protéines de liaison.....</b>	<b>32</b>
1.7.1 Les protéines de liaison dans les podocytes.....	32
1.7.2 Rôle des protéines de liaison dans la signalisation de l'IGF.....	33
1.7.3 L'IGFBP2 .....	34
1.7.3.1 Structure et activation.....	35
1.7.3.2 Actions indépendantes à l'IGF.....	36
1.7.3.3 Rôle d'IGFBP2 dans le diabète et ses complications .....	38
<b>Hypothèse/Problématique.....</b>	<b>39</b>
Objectifs .....	39
<b>Matériels et méthodes .....</b>	<b>40</b>
<b>2.1 Expérimentations chez la souris.....</b>	<b>40</b>
2.1.1 Mesure de la glycémie à jeun .....	41
2.1.2 Quantification de l'albumine urinaire .....	41
2.1.3 Mesure de la pression artérielle moyenne .....	42
2.1.4 Détermination du débit de filtration glomérulaire.....	42
2.1.5 Extraction des glomérules et des tubules rénaux.....	43
2.1.6 Mesure des niveaux d'IGFBP2 circulant.....	44
<b>2.2 Immunohistochimie.....</b>	<b>45</b>
2.2.1 Colorations.....	45
2.2.2 Acquisition d'images et quantification.....	46
<b>2.3 Microscopie électronique .....</b>	<b>46</b>

<b>2.4 Podocytes murins .....</b>	<b>46</b>
2.4.1 Milieu de culture .....	47
2.4.2 Culture des podocytes.....	47
2.4.3 Traitements des podocytes.....	48
2.4.4 Extraction cellulaire.....	50
<b>2.5 Analyses protéiques.....</b>	<b>51</b>
2.5.1 Immunobavardage .....	51
<b>2.6 Analyses de l'expression génique .....</b>	<b>54</b>
2.6.1 Extraction de l'ARNm.....	54
2.6.2 Transcription de l'ADNc.....	54
2.6.3 PCR quantitative (qPCR).....	55
<b>2.7 Analyses statistiques .....</b>	<b>58</b>
<b>Résultats.....</b>	<b>59</b>
<b>3.1 Suivi des souris.....</b>	<b>59</b>
<b>3.2 Pression artérielle moyenne des souris.....</b>	<b>60</b>
<b>3.3 Fonction rénale et marqueurs de la néphropathie diabétique.....</b>	<b>61</b>
<b>3.4 Pathologie glomérulaire .....</b>	<b>63</b>
<b>3.5 Effacement des pédicelles.....</b>	<b>65</b>
<b>3.6 Niveaux circulants d'IGFBP2 dans les souris .....</b>	<b>67</b>
<b>3.7 Inhibition des voies de signalisation de l'IGF/IGFBP dans les glomérules rénaux</b> .....	<b>67</b>
<b>3.8 Expression en ARNm des différentes IGFBPs et du récepteur IGF1R<math>\beta</math> <i>in vivo</i> .....</b>	<b>70</b>
<b>3.9 Expression en ARNm d'IGFBP2 dans le cortex rénal de souris diabétiques de type</b> <b>1 et 2 .....</b>	<b>72</b>
<b>3.10 Expression en ARNm d'IGFBP2 dans les podocytes <i>in vitro</i>.....</b>	<b>72</b>
<b>3.11 Inhibition des voies de signalisation de l'IGF-2 dans les podocytes murins <i>in</i></b> <b><i>vitro</i>.....</b>	<b>73</b>
<b>3.12 Effets de la protéine IGFBP2 sur la signalisation de l'IGF-2 dans les podocytes <i>in</i></b> <b><i>vitro</i>.....</b>	<b>74</b>
<b>Discussion.....</b>	<b>77</b>
<b>Impacts d'IGFBP2 sur le glomérule et la dysfonction podocytaire.....</b>	<b>78</b>
<b>Régulation et signalisation de l'IGF/IGFBP2 .....</b>	<b>82</b>
<b>Perspectives.....</b>	<b>86</b>
Effets de l'hyperglycémie dans les podocytes.....	86

Signalisation de l'IGFBP2 .....	87
Modèle murin de diabète de type 2 avec une surexpression ou une délétion d'IGFBP2 ..	88
<b>Conclusion .....</b>	<b>88</b>
<b>Liste des références.....</b>	<b>90</b>



## LISTE DES FIGURES

Figure 1 : L'anatomie du rein .....	13
Figure 2 : Représentation schématique d'un néphron .....	14
Figure 3 : Le glomérule .....	17
Figure 4 : Schématisation des fentes de filtration des podocytes .....	20
Figure 5 : Schématisation de l'insuline, l'IGF-1 et l'IGF-2 .....	27
Figure 6 : La signalisation de l'IGF via le récepteur IGF1R .....	29
Figure 7 : Les différents récepteurs de l'IGF .....	30
Figure 8 : Structure de l'IGFBP2 .....	35
Figure 9 : Les actions cellulaires de l'IGFBP2 .....	37
Figure 10 : Utilisation des différentes parties des reins de souris .....	44
Figure 11 : Protocole de culture et traitements des podocytes .....	49
Figure 12 : Programme pour le qPCR .....	57
Figure 13 : Pression artérielle moyenne des différents groupes de souris à 7 mois d'âge ...	60
Figure 14 : Impacts d'une surexpression ou d'une délétion d'IGFBP2 sur la fonction rénale et les marqueurs du développement de la néphropathie diabétique .....	62
Figure 15 : Impact de la protéine IGFBP2 sur le développement de la pathologie glomérulaire.....	64
Figure 16 : Impacts d'une surexpression ou d'une délétion d'IGFBP2 sur l'effacement des fentes de filtration des podocytes chez les souris .....	66
Figure 17 : Niveaux circulants d'IGFBP2 dans les différents groupes de souris .....	67
Figure 18 : Niveaux d'expression protéiques de différentes protéines dans les glomérules de souris .....	69
Figure 19 : Niveaux d'expression en ARNm de différentes IGFBPs et d'IGF1R dans les glomérules de souris .....	71
Figure 20 : Niveaux d'expression en ARNm d'IGFBP2 dans le cortex rénal de souris diabétiques de type 1 et de type 2.....	72
Figure 21 : Expression d'IGFBP2 dans les podocytes murins en culture .....	73
Figure 22 : Inhibition des voies de signalisation d'IGF-2 dans les podocytes en culture ....	74
Figure 23 : Effets du palmitate et du IGFBP2 dans les podocytes in vitro .....	75

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Liste des six différents groupes de souris .....	41
Tableau 2 : Composition du tampon de lyse .....	50
Tableau 3 : Composition du tampon Laemmli .....	51
Tableau 4 : Composition du gel d'acrylamide .....	52
Tableau 5 : Liste des anticorps utilisés .....	53
Tableau 6 : Préparation du MasterMix SYBR Green 2X .....	56
Tableau 7 : Séquences des amorces utilisées pour les expériences de qPCR.....	56
Tableau 8 : Protocole d'une réaction de qPCR.....	57
Tableau 9 : Mesures des poids et des glycémies des souris à 7 mois d'âge .....	59

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

ACE	Enzyme de conversion de l'angiotensine
ACEi	Inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine
ADH	Hormone antidiurétique
ALS	Sous-unité labile aux acides
AMDCC	<i>Animal Models of Diabetic Complications Consortium</i>
AMPK	<i>AMP-activated protein kinase</i>
Ang II	Angiotensine II
ATP	Adénosine-Triphosphate
AT1R	Récepteur de type 1 de l'angiotensine II
AVC	Accident vasculaire cérébral
BEACON	<i>Bardoxolone Methyl Evaluation in Patients with Chronic Kidney Disease and Type 2 Diabetes Mellitus : the Occurrence of Renal Events</i>
CLI	<i>Critical limb ischemia</i>
ColIV	Collagène de type IV
DAG	Diacylglycérol
DTT	Dithiothréitol
eIF2 $\alpha$	<i>Eukaryotic initiation factor 2</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
eNOS	<i>Endothelial nitric oxide synthase</i>
EGFR	<i>Epidemial growth factor receptor</i>
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i>
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i>
Fn1	Fibronectine 1
GFR	<i>Glomerular filtration rate</i>
GH	Growth hormone
GLUT	<i>Glucose transporter</i>
HBD	Domaine de liaison à l'héparine
HCO $_3^-$	<i>Hydrogénocarbonate</i>
HE	<i>Hématoxyline et éosine</i>
HG	<i>High glucose</i>
HLA	Antigènes leucocytaires humains
HNF	Facteur nucléaire hépatocytaire
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
ICAM	<i>Intracellular adhesion molecule</i>
IFN $\gamma$	Interféron gamma
IGF	<i>Insulin-like growth factor</i>
IGF1R	Récepteur à l'IGF de type 1
IGF2R	Récepteur à l'IGF de type 2
IGFBP	<i>Insulin-like growth factor binding proteins</i>
IKK $\beta$	<i>Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit beta</i>
IL-6	Interleukine-6
IMC	Indice de masse corporelle

IR	<i>Insulin receptor</i>
IRS-1	<i>Insulin receptor substrate 1</i>
ISH	<i>Hybridation in situ</i>
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinase</i>
KIM-1	<i>Kidney Injury Molecule-1</i>
LADA	<i>Latent autoimmune diabetes of the adult</i>
LDL	<i>Low-density lipoprotein</i>
MAP	<i>Maladie des artères périphériques</i>
MAPK	<i>Mitogen activated protein kinase</i>
MCP-1	<i>Macrophage-chemotactic protein 1</i>
MEB	<i>Microscopie électronique à balayage</i>
MET	<i>Microscopie électronique à transmission</i>
MODY	<i>Maturity-onset diabetes of the young</i>
MTHFR	<i>Encoding methylenetetrahydrofolate reductase</i>
mTORC1	<i>Mechanistic target of rapamycin complex 1</i>
NCK	<i>Non-catalytic region of tyrosine kinase adaptor protein</i>
NG	<i>Normal glucose</i>
NHE1	<i>Sodium-hydrogen antiporter 1</i>
Nrf2	<i>Nuclear factor erythroid-derived 2-like 2</i>
OCC	<i>Occlusion</i>
OCT	<i>Optimal cutting temperature</i>
P/S	<i>Pénicilline/Streptomycine</i>
PAS	<i>Acide périodique de Schiff</i>
PDGF	<i>Platelet-derived growth factor</i>
PI3K	<i>Phosphoinositide 3-kinase</i>
PMA	<i>Phorbol 12-myristate 13-acetate</i>
PTEN	<i>Phosphatase and TENsin homolog</i>
qPCR	<i>PCR quantitative</i>
RAGE	<i>Receptor for advanced glycation end products</i>
RGD	<i>Arginine-Glycine-Asparagine</i>
RIPA	<i>Radio-Immunoprecipitation Assay</i>
ROS	<i>Espèces réactives de l'oxygène</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute Medium</i>
RPTP $\beta$	<i>Récepteur de protéines tyrosines phosphatases bêta</i>
RTK	<i>Récepteurs tyrosine kinases</i>
SD	<i>Déviations standard</i>
SGLT1	<i>Sodium-glucose transport proteins 1</i>
SGLT2	<i>Sodium-glucose transport proteins 2</i>
SHP-1	<i>SH2 domain containing protein tyrosine phosphatase 1</i>
SRA	<i>Scavenger receptor A</i>
STAT3	<i>Signal transducer and activator of transcription 3</i>
TGF- $\beta$	<i>Transforming growth factor beta</i>
TNF- $\alpha$	<i>Facteur de nécrose tumorale alpha</i>
TRPC6	<i>Transient receptor potential cation channel 6</i>
VCAM-1	<i>Vascular cell adhesion molecule</i>
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>

VPR

Pression volumique

# INTRODUCTION

## 1.1 Le diabète

Le diabète est une maladie chronique où l'insuline n'est pas produite par le corps ou n'est pas correctement utilisée. Puisque cette hormone permet entre autres l'entrée de glucose dans les cellules, son mauvais fonctionnement entraîne une augmentation des niveaux de glucose sanguin. Cette hyperglycémie peut ultimement induire des dommages aux vaisseaux sanguins, aux nerfs ainsi qu'aux organes (Diabetes Canada, 2020). Selon les données du Système canadien de surveillance des maladies chroniques, environ 3,2 millions de Canadiens ont été diagnostiqués diabétiques en 2019, ce qui représente environ 1 enfant ou adolescent sur 333 et 1 adulte sur 9. Il a également été observé que la prévalence d'un diabète diagnostiqué semble augmenter avec l'âge et cette prévalence paraît plus faible chez la femme (10,0 %) que chez l'homme (11,8 %). Il a été évalué que le nombre de personnes vivant avec le diabète ne fera qu'augmenter au cours des prochaines années en raison de la croissance et du vieillissement de la population<sup>1</sup>.

Les personnes vivant avec le diabète possèdent un risque plus élevé de développer des complications vasculaires causant des répercussions très néfastes sur la santé. Parmi ces complications, on retrouve les accidents cérébrovasculaires, la défaillance rénale, l'infarctus du myocarde ainsi que l'amputation des membres inférieurs. Statistiquement, les individus souffrant de diabète sont 12 fois plus à risque d'être atteint d'insuffisance rénale de stade terminale et 18 fois plus à risque de subir une amputation d'un membre inférieur que des individus non-diabétiques. Ces complications peuvent grandement diminuer la qualité de vie de ces personnes<sup>2</sup>.

Le diabète n'engendre pas seulement des problèmes pour les individus, mais également pour le système de santé. En 2000, une estimation totale des coûts directement associés au diabète et à ses complications a été évaluée à 2,5 milliards de dollars au Canada. Ces coûts sont estimés à 4,9 milliards en 2030 (Diabetes Canada, 2020).

---

<sup>1</sup> Faits saillants du Système canadien de surveillance des maladies chroniques (Agence de la santé publique du Canada 2017)

<sup>2</sup> Diabetes in Canada: Facts and figures from a public health perspective (Agence de la Santé Publique du Canada 2011)

Tous les différents types de diabète sont caractérisés par une incapacité du corps à maintenir son taux de glucose sanguin à des concentrations physiologiques normales. On retrouve 2 formes principales du diabète, soit le diabète de type 1 et de type 2. Ces deux types diffèrent par l'origine des problèmes qui engendrent une glycémie élevée. Il existe plusieurs critères afin de diagnostiquer la maladie au Canada, notamment une glycémie supérieure ou égale à 7,0 mmol/L et un taux d'hémoglobine glycosylée d'au moins 6,5 %. Un autre critère de diagnostic est une glycémie supérieure ou égale à 11,1 mmol/L après un test de tolérance au glucose. Il n'existe toujours aucune façon de guérir le diabète malgré les nombreuses recherches effectuées, cependant plusieurs traitements ayant pour objectif de diminuer et de minimiser les impacts de la maladie sur la qualité de vie des personnes sont utilisés à ce jour.

## **1.2 Types de diabète**

### ***1.2.1 Diabète de type 1***

Le diabète de type 1, souvent appelé le diabète juvénile ou le diabète insulino-dépendant, est une maladie auto-immune chronique qui représente environ 5-10% des patients diabétiques. Il se produit lorsque le système immunitaire attaque les cellules bêta des îlots de Langerhans du pancréas, responsables de la production et de la sécrétion de l'insuline, une hormone hypoglycémisante. Le pancréas est un organe du système digestif qui permet la sécrétion exocrine de plusieurs enzymes favorisant la digestion et l'absorption dans l'intestin grêle. Sa fonction endocrine est la production d'hormones telles que le glucagon, une hormone hyperglycémisante, ainsi que l'insuline. En absence de pathologie, l'insuline permet de faire entrer le glucose dans les cellules du muscle et du tissu adipeux lorsque la concentration extracellulaire en glucose est élevée. Le glucose entre dans la cellule bêta par diffusion facilitée via le transporteur du glucose 2 (*glucose transporter*, GLUT) pour être converti en adénosine triphosphate (ATP) par le processus de la glycolyse (Thorens, 2015). L'augmentation de la concentration locale d'ATP va permettre de fermer les canaux potassiques et créer un potentiel membranaire, favoriser l'entrée d'ions calcium qui vont ensuite permettre la fusion des vésicules d'insuline à la membrane cellulaire. L'insuline ainsi sécrétée va lier son récepteur transmembranaire et enclencher une cascade de signalisation activant la translocation des GLUT à la membrane cellulaire permettant l'entrée de glucose et le retour à une glycémie normale. L'apoptose des cellules bêta des îlots de Langerhans va créer des dommages assez importants dans le pancréas, ce qui va ultimement mener à la

réduction et à l'élimination de la production d'insuline dans le corps. Plusieurs symptômes sont associés avec l'hyperglycémie dans le diabète de type 1, tels qu'une sensation de soif intense (polydipsie), une sensation de faim (polyphagie), une production excessive d'urine (polyurie), une perte de poids, des douleurs abdominales, une fatigue anormale et des vomissements (Canadian Diabetes Association Clinical Practice Guidelines Expert Committee *et al.*, 2013).

Le diabète de type 1 se développe majoritairement à l'enfance ou à l'adolescence et les anticorps responsables de la mort des cellules bêta apparaissent bien avant les premiers signes cliniques (Fenske *et al.*, 2018). Minimale, la présence de deux anticorps différents contre les cellules bêta du pancréas est nécessaire pour le développement du diabète. Ces anticorps peuvent être dirigés contre les cellules bêta, contre l'insuline ou encore contre l'acide glutamique décarboxylase (Jahromi et Eisenbarth, 2007). La cause du diabète de type 1 est encore inconnue pour le moment, mais plusieurs facteurs augmentant le risque du développement de la maladie ont été identifiés. La maladie semble influencée à la fois par des facteurs génétiques et environnementaux. Il a été démontré qu'une grande partie des patients diabétiques possèdent des mutations au niveau des loci HLA (antigènes leucocytaires humains) DR (Beauchamp et Haller, 2015). Cependant, le diabète de type 1 ne se développe pas seulement à cause d'une mutation génétique, d'autres facteurs génétiques et environnementaux sont nécessaires. La diète, les infections virales et bactériennes ainsi que l'ethnicité font partie de ces facteurs, bien que leurs mécanismes d'action soient encore peu connus (Vehik et Dabelea, 2010).

À ce jour, le diabète de type 1 reste une maladie considérée incurable puisqu'aucun traitement ne permet une guérison complète. La qualité de vie des personnes atteintes de la maladie a toutefois été grandement améliorée grâce à la production et l'administration d'insuline humaine recombinante, leur permettant un meilleur contrôle glycémique.

### ***1.2.2 Diabète de type 2***

Le diabète de type 2 se démarque particulièrement du type 1, puisqu'il ne consiste pas en la destruction des cellules bêta du pancréas. Chez les personnes atteintes de la maladie, l'insuline est bel et bien produite, mais il est incapable d'être utilisé adéquatement par les cellules de l'organisme, puisque la liaison de l'insuline à son récepteur va provoquer une réponse qui est inadéquate. On assiste au départ à une augmentation de la résistance des



cellules envers l'insuline, sans toutefois observer d'augmentation des niveaux de glucose sanguin, puisque la sécrétion de l'insuline est accrue. Il s'agit de ce qu'on appelle le prédiabète. Ensuite, on assiste à un épuisement des cellules bêta qui ne seront plus aptes à fournir l'insuline nécessaire pour conserver les niveaux de glucose sanguin à des valeurs normales. Il s'agit d'un phénomène que l'on appelle la résistance à l'insuline et qui cause une élévation des niveaux de glucose plasmatique, ce dernier étant incapable d'entrer dans les cellules (Altaf *et al.*, 2015). Cette perte des actions de l'insuline aura également des effets sur le métabolisme des acides gras (DeFronzo, 2010). Lorsqu'ils sont trop présents dans le corps, ils peuvent s'accumuler de façon anormale dans certains tissus, tels que les reins, le cœur et le foie et contribuer au phénomène que l'on appelle la lipotoxicité (Lin et Sun, 2009). Le diabète de type 2 est le type de diabète le plus prévalent, représentant 90 % des cas (Henning, 2018). Plusieurs facteurs de risque génétiques et environnementaux participent au développement de la maladie, tels que l'âge et les antécédents familiaux, mais également l'alimentation, la sédentarité et l'obésité (Johnson *et al.*, 2006). Le diabète de type 2 apparaît généralement à l'âge adulte et plusieurs traitements sont disponibles afin d'aider les personnes souffrant de la maladie. La perte de poids et le contrôle de l'alimentation sont deux moyens courants de réduire la quantité de sucre et le surplus de graisse corporelle. Des agents pharmacologiques, tels que des hypoglycémifiants, des sensibilisateurs à l'insuline et des injections d'insuline sont également utilisés, dans le but de réduire et de garder des niveaux de glucose sanguin à des valeurs acceptables et ainsi diminuer les risques de complications. Parmi les plus utilisés, on retrouve la metformine qui entraîne une baisse de l'hyperglycémie en bloquant la production de glucose par le foie (Altaf *et al.*, 2015).

### ***1.2.3 Les autres types de diabète***

En plus du diabète de type 1 et de type 2, il existe d'autres types de diabète et de conditions qui peuvent créer une augmentation de la glycémie. Parmi ceux-ci, on retrouve le diabète gestationnel, le diabète auto immunitaire latent chez l'adulte (*Latent autoimmune diabetes of the adult*, LADA) et différentes formes monogéniques du diabète qui affectent les protéines de la voie de l'insuline.

### *1.2.3.1 Diabète gestationnel*

Le diabète gestationnel apparaît durant la grossesse chez certaines femmes et se caractérise par une augmentation du glucose sanguin (Plows JF *et al.*, 2018). Il est estimé qu'environ 6% des femmes enceintes vont développer ce type de diabète, dépendamment des facteurs de risque (Mack et Tomich, 2017). Il est principalement causé par l'augmentation de la production d'hormones par le placenta et de la masse adipeuse durant la grossesse, qui vont modifier la sensibilité de la femme à l'insuline. Une augmentation de la production de l'insuline ne permet généralement pas de compenser pour cette résistance à l'insuline. L'apparition de la pathologie se fait de façon générale durant le deuxième trimestre et progresse jusqu'au troisième trimestre. Il existe des facteurs de risques connus pour les femmes souffrant de diabète gestationnel, comme une augmentation des risques de souffrir de prééclampsie, de dépression et de développer un diabète de type 2. Malheureusement, le fœtus est également à risque de développer certains problèmes de santé, tels qu'un surpoids à la naissance, augmentant les risques de complications à l'accouchement. Le nouveau-né est aussi plus susceptible de souffrir d'embonpoint et de développer le diabète de type 2 au cours de sa vie. Normalement, le diabète gestationnel est temporaire et la résistance à l'insuline disparaît après la grossesse. Il nécessite tout de même un suivi important et des changements au niveau des habitudes de vie peuvent aider à réduire les risques de la maladie pour la mère et le futur enfant. Un changement dans la diète alimentaire accompagné d'injection d'insuline peut aider à contrôler la glycémie plus efficacement. Des sensibilisateurs à l'insuline peuvent aussi être utilisés. Ces traitements n'ont démontré aucun impact négatif sur la santé du fœtus (Baz *et al.*, 2016).

### *1.2.3.2 Diabète auto immun latent chez l'adulte*

Le LADA est une maladie qui ressemble grandement au diabète de type 2, mais les personnes atteintes de la maladie sont insulino-dépendantes, de façon similaire au diabète de type 1 (Grill, 2019). La présence d'anticorps contre les cellules bêta du pancréas permet d'identifier cette pathologie qui se développe chez 1 à 2% des patients atteints de diabète de type 2 (Owen *et al.*, 2003). Il est diagnostiqué généralement chez les patients entre 15 et 30 ans, mais ces personnes ne nécessitent pas d'insuline avant les 6 mois qui suivent le diagnostic (Laugesen *et al.*, 2015).

### 1.2.3.3 Formes monogéniques du diabète

De façon assez rare, certaines mutations génétiques peuvent causer une augmentation du glucose sanguin et mener à un diagnostic de diabète. On regroupe ces pathologies dans les formes monogéniques du diabète, qui peuvent être classifiées en deux, soit le *maturity-onset diabetes of the young* (MODY) et le *neonatal diabetes mellitus*, une condition assez rare qui affecte le bon développement du pancréas durant les premiers mois de vie. Le MODY constitue environ 1% des cas de diabète et survient généralement avant 25 ans. La maladie est généralement causée par une mutation dans certaines protéines impliquées au niveau de la voie de l'insuline. Parmi les mutations les plus fréquentes, on retrouve celles dans le gène de la glucokinase (MODY 2), une enzyme responsable de la production de glucose-6-phosphate, ainsi que dans le facteur nucléaire hépatocytaire (HNF) 1a et 4a (MODY 3 et MODY 1) qui régule le gène de l'insuline (Anik *et al.*, 2015). Les symptômes du MODY varient selon le type de mutation et peuvent aller d'une hyperglycémie légère à un risque élevé de développer des complications microvasculaires.

## 1.3 Les complications vasculaires

L'hyperglycémie prolongée qu'on retrouve chez les patients atteints de diabète peut mener au développement de plusieurs complications vasculaires à court et à long terme. Les complications à court terme sont causées majoritairement par des niveaux trop faibles ou trop élevés de glucose dans le sang. Sans traitement rapide, ces complications peuvent mener à la mort du patient et sont donc très importantes à étudier. Un exemple est l'acidocétose diabétique, causant un excès de cétones dans le corps du patient et peut provoquer des vomissements, des étourdissements et un état comateux. Une période d'hypoglycémie va quant à elle provoquer de la confusion et une perte de conscience chez ces personnes (Modi *et al.*, 2017).

À plus long terme, une hyperglycémie, une hypertension ainsi qu'une dyslipidémie vont avoir un impact sur les vaisseaux sanguins. Des dommages macrovasculaires peuvent causer l'athérosclérose et la maladie des artères périphériques alors que des dommages microvasculaires vont plutôt engendrer la rétinopathie, la neuropathie et la néphropathie diabétique.

### 1.3.1 Athérosclérose

L'athérosclérose représente la principale complication d'ordre macrovasculaire du diabète. Il s'agit d'une cause majeure d'accident vasculaire cérébral (AVC) et d'infarctus du myocarde auprès des personnes diabétiques, qui possèdent un risque de développer ces maladies de 2 à 4 fois supérieur comparé au reste de la population (Booth *et al.*, 2006). L'athérosclérose se produit à un site où l'endothélium va être endommagé et cible les artères coronariennes, les extrémités inférieures et les artères de la carotide extra crânienne (Beckman *et al.*, 2002). La maladie se caractérise par un durcissement et un épaississement des artères causés par une accumulation de gras, de cholestérol ainsi que de calcium. Les causes du développement de la maladie sont complexes, avec la dérégulation de plusieurs types cellulaires, mais la physiopathologie reste assez semblable entre les différents patients. À la suite d'un dommage à l'endothélium, la perméabilité de celle-ci est modifiée et les lipoprotéines de basse densité (*low-density lipoprotein*, LDL) oxydées circulantes peuvent passer au travers de l'endothélium et venir augmenter l'expression de quelques protéines de surface, telles que la protéine d'adhésion aux cellules vasculaires (*vascular cell adhesion molecule*, VCAM-1), la protéine *intracellular adhesion molecule* (ICAM) et la P-sélectine. Leurs rôles sont de favoriser une adhésion efficace à l'endothélium ainsi que d'assurer l'infiltration des monocytes et des lymphocytes circulants dans le sang. Les monocytes vont ensuite se retrouver sous la couche et devenir des macrophages. Les LDL oxydés vont induire la sécrétion de chimiokines comme la protéine *macrophage-chemotactic protein 1* (MCP-1) par les cellules endothéliales du vaisseau. Cette protéine attire les macrophages qui vont pouvoir capter les LDL oxydés avec l'aide de récepteurs qu'on appelle «*scavenger*», comme le *scavenger receptor A* (SRA), CD36 et CD68 afin de devenir des cellules spumeuses. Ces cellules sont capables de sécréter des métalloprotéases qui sont des enzymes pouvant dégrader le collagène, mais sécrètent également des cytokines et des facteurs de croissance comme le *platelet-derived growth factor* (PDGF) qui vont amplifier la réponse inflammatoire. On assiste ensuite à une infiltration des cellules musculaires lisses dans l'intima, qui vont pouvoir proliférer dans la tunique interne et produire de la matrice extracellulaire. Après la sécrétion des fibres de collagène, il y a formation de la chape fibreuse qui recouvre la lésion. Plus la plaque prend de l'expansion, plus le risque augmente, ce qui a pour effet de rétrécir la lumière artérielle et donc diminuer le flot sanguin. Les

cellules spumeuses entrent ensuite en apoptose lorsqu'elles deviennent gorgées en lipides et il va se créer ce qu'on appelle le noyau nécrotique, une région acellulaire qu'on trouve au centre de la lésion. Cette région va contribuer à la formation de plaques athérosclérotiques instables qui auront de grandes chances de rupture, ce qui pourrait potentiellement entraîner la formation d'un caillot capable d'obstruer la lumière artérielle et causer une ischémie cardiovasculaire (Zeadin *et al.*, 2013, Thiruvoipati *et al.*, 2015). Lorsque les artères touchées se retrouvent au niveau des membres inférieurs, on assiste au développement d'une autre complication appelée la maladie des artères périphériques.

### ***1.3.2 La maladie des artères périphériques***

La maladie des artères périphériques (MAP) est une complication macrovasculaire du diabète touchant majoritairement les membres inférieurs. Il s'agit d'une maladie où l'incidence augmente avec l'âge, passant de 4,3% chez les personnes de plus de 40 ans à 14,5% chez les 70 ans et plus (Selvin et Erlinger, 2004). Parmi les symptômes les plus courants de la maladie, on retrouve un engourdissement ou une fatigue musculaire après l'effort, mais qui disparaît au repos. Il est connu depuis longtemps qu'un manque d'apport sanguin aux membres inférieurs peut causer des douleurs intenses, qu'on appelle claudication intermittente (Criqui et Aboyans, 2015). La maladie peut également s'aggraver pour évoluer vers une ischémie critique du membre inférieur (*critical limb ischemia, CLI*).

Les symptômes sont alors plus nombreux, avec une faiblesse et un engourdissement des pieds et des jambes au repos, une basse température de la peau, des ongles secs et fragiles ainsi que des plaies et des ulcères qui guérissent lentement ou ne guérissent pas du tout. La MAP est très souvent prise au sérieux, puisqu'elle est un marqueur important d'athérosclérose dans une autre région du corps (Criqui, 2001). Dans la paroi interne d'une artère, il arrive que des plaques d'athéromes diminuent la lumière artérielle de façon importante, entraînant ainsi une ischémie, c'est-à-dire la diminution de l'apport sanguin, dans le muscle inférieur. L'oxygénation des cellules est ainsi diminuée, ce qui affecte négativement leurs fonctions. Chez les personnes en bonne santé, cette hypoxie entraîne le début d'un processus appelé angiogenèse, qui permet la création de nouveaux vaisseaux sanguins permettant d'acheminer l'oxygène à la zone atteinte. En revanche, ce processus est grandement altéré chez les personnes souffrant de diabète et les risques de complications sont alors plus élevés.

L'hygiène de vie peut avoir un impact important sur le développement de la maladie et les personnes souffrantes de la MAP doivent contrôler leur activité physique, leur diète et leur glycémie de façon responsable. Il existe également des traitements pharmacologiques pouvant améliorer la qualité de vie de ces personnes, tels que l'utilisation d'agents antiplaquettaires, de statines ou d'inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACEi). Il arrive cependant que les dommages soient trop importants et une intervention chirurgicale sera alors nécessaire. Il est possible de rediriger le flot sanguin vers la zone endommagée avec une greffe vasculaire, ce qu'on appelle un pontage. Certaines interventions moins invasives peuvent aussi aider à ralentir le développement de la MAP, comme l'angioplastie permettant d'augmenter le diamètre des artères ainsi que l'athérectomie pour enlever les plaques d'athérome. Ces dernières n'ont qu'une efficacité à court terme (Twine *et al.*, 2009, Ambler *et al.*, 2014).

### ***1.3.3 La rétinopathie diabétique***

Parmi les complications microvasculaires du diabète, on retrouve la rétinopathie diabétique qui cause des dommages aux yeux et pouvant mener jusqu'à une perte de la vue dans les cas les plus extrêmes. Il s'agit même de la première cause de cécité chez les personnes en âge de travailler et la première cause de cécité au Canada (Kanjee et Dookeran, 2016). Il est estimé qu'environ 60% des personnes diabétiques de type 2 vont développer cette complication. Mise à part son impact sur la vision, la rétinopathie est associée à une augmentation des risques de complications vasculaires systémiques. La maladie est connue pour provoquer des modifications au niveau des vaisseaux sanguins de la rétine de l'œil.

La rétinopathie va évoluer avec le temps et peut être divisée en 4 phases selon le degré de sévérité des symptômes. Au cours de la première phase, qu'on appelle rétinopathie non proliférante légère, les petits vaisseaux sanguins de la rétine sont enflés et donc moins perméables, favorisant des fuites. Au moment de la deuxième phase, la rétinopathie non proliférante modérée, des vaisseaux sanguins se rendant jusqu'à la rétine peuvent contenir des fuites ou être totalement bloqués. Une augmentation de ces blocages au niveau de la rétine va mener jusqu'à la troisième phase de la maladie, qu'on appelle rétinopathie proliférante sévère. Avec le temps, la quatrième et dernière phase de la maladie apparaît et on parle maintenant de rétinopathie proliférative. À cette étape, des vaisseaux sanguins immatures se forment dans la rétine et le gel vitreux de l'œil. Étant immatures, ces vaisseaux

brisent facilement et provoquent des fuites intenses dans l'œil et vont mener à une perte de vision importante et la cécité (Fong *et al.*, 2003).

De plus en plus d'études démontrent qu'une hyperglycémie chronique et une hypertension prolongée seraient responsables de l'initiation de plusieurs cascades biochimiques favorisant le développement de la maladie. Quelques voies métaboliques connues pourraient avoir un rôle important dans ce développement, notamment la formation de produits finaux de glycation avancée, le stress oxydatif ainsi que l'activation de la protéine kinase C (Cheung *et al.*, 2010). Ces voies vont mener à une dysfonction de l'endothélium vasculaire en modulant le métabolisme, la signalisation et les facteurs de croissance cellulaires. Des voies comme celles du *vascular endothelial growth factor* (VEGF), de la *growth hormone* (GH), de l'*insulin-like growth factor* (IGF) et de l'érythropoïétine ont été identifiées. Pour prévenir l'apparition de la rétinopathie diabétique, ou ralentir sa progression, un bon contrôle glycémique est recommandé. Il a également été démontré que la photocoagulation par laser peut être efficace à 90% pour prévenir la perte de vision (Gupta *et al.*, 2012). L'utilisation d'antioxydants pourrait également ralentir la progression de la maladie, ceux-ci permettant de réduire l'activation de PKC  $\beta$ II dans la rétine (Kunisaki *et al.*, 1995). Plus récemment, un inhibiteur de l'angiogenèse appelé Bevacizumab, un anti-VEGF, a fait son apparition et permettrait de réduire totalement la néovascularisation de l'œil lorsqu'il est injecté directement dans l'humeur vitrée (Avery *et al.*, 2006).

### ***1.3.4 La neuropathie diabétique***

Une autre complication importante du diabète est la neuropathie, la principale cause de neuropathie en Amérique du Nord, qui affecte environ 30% des personnes atteintes du diabète. Cette complication affecte les membres inférieurs, majoritairement les pieds (Said, 2007). Parmi les symptômes les plus courants, on retrouve une perte de sensations du membre, des picotements, une douleur ou un engourdissement soutenu pouvant ultimement mener à des infections, des ulcérations et l'amputation. Les symptômes vont apparaître à la base du membre et progresser de façon proximale vers le haut du corps, affectant de plus en plus la qualité de vie du patient.

Les facteurs de risque les plus importants sont une hyperglycémie prolongée et une dyslipidémie, qu'on retrouve chez les patients atteints du diabète de type 2 et qui vont mener à l'apoptose des cellules neuronales. Ces facteurs vont affecter négativement des voies de

signalisation importantes pour l'intégrité des cellules neuronales. Plusieurs gènes ont également été identifiés comme facteur de risque, tels qu'ACE et l'*encoding methylenetetrahydrofolate reductase* (MTHFR), mais nécessitent plus de recherches. À ce jour, un bon contrôle glycémique reste le moyen le plus efficace pour réduire les chances de développer la maladie. En revanche, il a été démontré qu'une bonne gestion de la glycémie avait des effets presque inexistantes chez les personnes atteintes de diabète de type 2. L'exercice est maintenant de plus en plus étudié comme moyen de réduire l'apparition et la progression de la maladie ainsi qu'un meilleur contrôle lipidique et des niveaux de cholestérol. Les antidouleurs peuvent réduire les effets néfastes de la maladie et améliorer la qualité de vie des patients dans les cas plus graves (Feldman *et al.*, 2019).

### ***1.3.5 La néphropathie diabétique***

La néphropathie diabétique est l'une des complications les plus présentes et les plus graves du diabète, étant la principale cause d'insuffisance rénale de stade terminal en Amérique du Nord et causant la mort de millions de personnes à travers la planète (Papadopoulou-Marketou *et al.*, 2017). Il est estimé qu'entre 30 et 40% des personnes diabétiques vont développer la néphropathie, entraînant des coûts extrêmement élevés pour les traitements tels que la dialyse et la transplantation rénale. Les principales causes du développement de la maladie sont une hyperglycémie chronique et une hypertension prolongée (Yan-Ming *et al.*, 2013). La pathologie survient à la suite de dommages microvasculaires dans les glomérules rénaux. Chez les personnes diabétiques, la fonction de plusieurs organes diminue et des anomalies tissulaires se produisent, alors que l'hyperglycémie entraîne une homéostasie anormale du flux sanguin et de la perméabilité vasculaire au niveau du glomérule. Il en résulte une augmentation du débit sanguin et de la pression intracapillaire, augmentant alors la sensibilité à l'angiotensine II. L'augmentation de cette pression ainsi que le dysfonctionnement des cellules endothéliales rénales entraînent une excrétion d'albumine élevée. C'est ce qu'on appelle l'albuminurie, connu pour être le premier signe clinique de la maladie. À ce stade assez précoce, cette augmentation de la perméabilité est réversible, mais une exposition continue à des niveaux élevés de glucose va créer des lésions trop importantes et rendre la pathologie irréversible. En absence de traitement, environ 80% des diabétiques de type 1 avec une microalbuminurie vont progresser vers la néphropathie diabétique. Chez les personnes atteintes de diabète de type 2, ce nombre est diminué entre seulement 20 et



40% des patients (Nielsen *et al.*, 1997). La néphropathie diabétique peut être diagnostiquée plusieurs années après les premiers dommages aux glomérules, puisque les premiers signes cliniques n'apparaissent que bien plus tard (Powell *et al.*, 2013). Cependant, l'hypertension peut agir en tant que prédicteur efficace de la maladie. En combinaison avec la microalbuminurie, il est estimé qu'environ 50% des personnes atteintes du diabète de type 1 souffrant d'hypertension vont progresser vers l'insuffisance rénale de stade terminale au cours des dix prochaines années (Raile *et al.*, 2007).

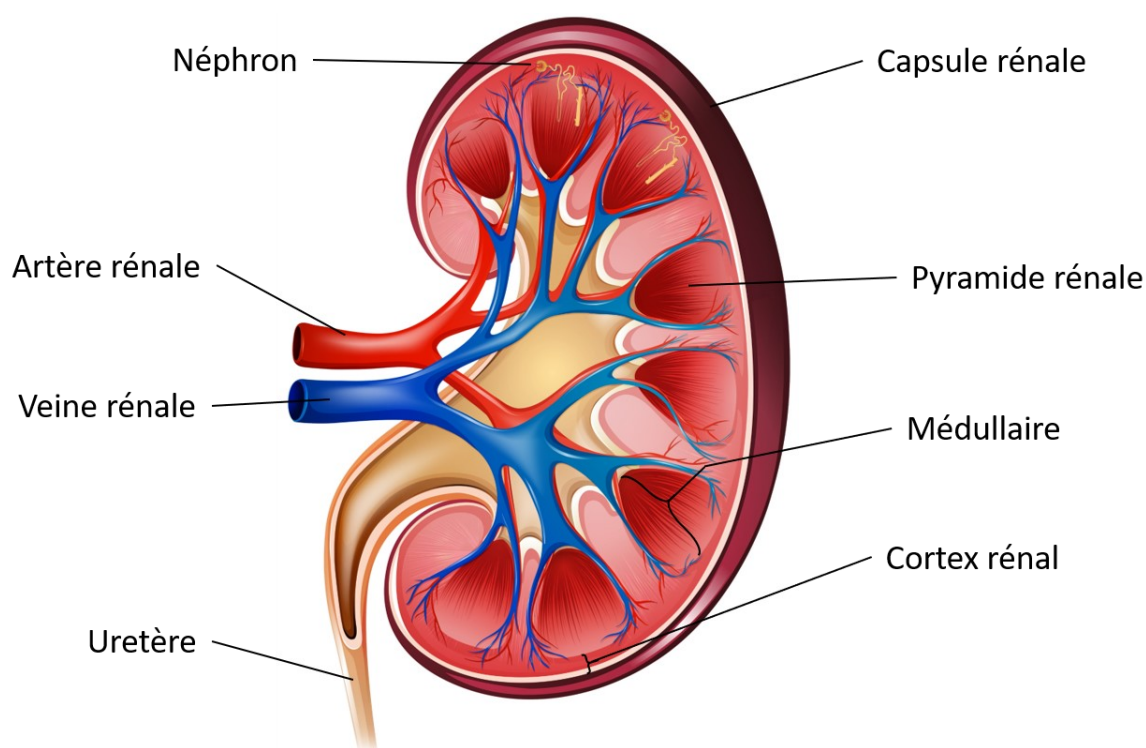
La néphropathie diabétique peut se diviser en plusieurs phases de développement. On assiste en premier lieu à des changements fonctionnels dans le néphron, l'unité fonctionnelle du rein. On observe une hyperfiltration glomérulaire et une hypertrophie, avant même les premiers signes cliniques. Il en suit un épaissement de la membrane basale et une augmentation de la matrice extracellulaire, qu'on appelle le mésangium, suivi de la différenciation et l'apoptose des podocytes. Ultiment, les dommages deviennent trop importants et la maladie progresse vers une fibrose tubulaire et l'insuffisance rénale de stade terminale, nécessitant des traitements tels que la dialyse et la transplantation rénale (Dronavalli *et al.*, 2008).

La perte des podocytes représente un enjeu important dans le développement de la néphropathie diabétique. Ce sont des cellules grandement importantes et leur perte diminue de façon importante la filtration glomérulaire, puisqu'elles sont responsables de la filtration la plus fine et la plus spécifique du sang. L'apoptose des podocytes provoque leur détachement de la membrane basale et les cellules se retrouvent dans l'urine, ce qu'on appelle la podocyturie. Il est primordial de bien comprendre le rôle des différentes composantes et des mécanismes qui sont impliqués dans la néphropathie diabétique, notamment la physiologie du rein qui sera décrit dans la prochaine section.

#### **1.4 Physiologie du rein**

Le rein est un organe vital au bon fonctionnement du corps humain. Il occupe plusieurs rôles importants au sein de l'organisme, notamment la filtration du sang, l'élimination des toxines, la régulation de la tension corporelle et l'équilibre des différents ions, la production d'hormones et l'excrétion de l'urine contenant les déchets. L'être humain possède deux reins d'une grosseur d'environ 10 cm chacun qu'on retrouve dans la partie arrière de l'abdomen au niveau des deux dernières côtes. Le sang entre dans le rein par l'artère rénale et ressort

par la veine rénale et peut contenir jusqu'à 20% du débit sanguin en provenance du cœur. Il est estimé que les deux reins peuvent filtrer environ 180 L de sang en une journée. Deux régions principales forment le rein, soit le cortex et la médulla, et sont composées de nombreux tubules excréteurs associés à un vaisseau sanguin (Figure 1). L'unité fonctionnelle du rein se nomme le néphron et est composée d'un tubule et d'une boule de capillaire qu'on appelle un glomérule (Figure 2). Un seul rein peut être composé d'environ 1 million de néphrons (Wallace, 1998).



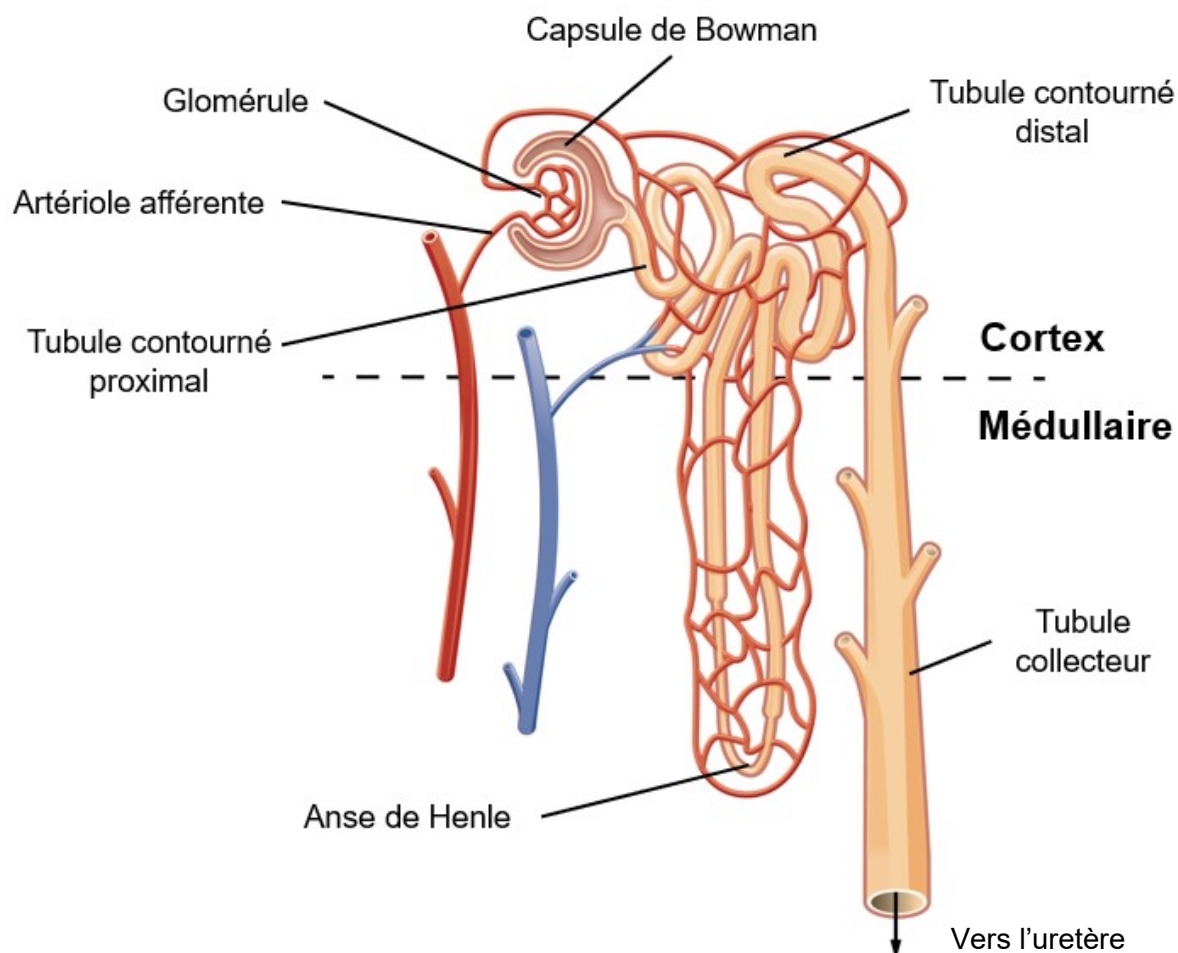
**Figure 1 : L'anatomie du rein**

Représentation schématique d'une coupe transversale d'un rein montrant les différentes parties qui le compose (Modifiée de Kidneyfund.org, 2021).

#### **1.4.1 Les tubules**

Les tubules ont un rôle important au sein du rein. Ils participent à la filtration du sang tout en régulant l'équilibre hydrique, en réabsorbant diverses molécules filtrées par le glomérule et en excréant des déchets sous la forme d'urine. Un tubule est composé de différentes

sections, ayant toutes un rôle dans la transformation du filtrat du glomérule en urine pour être excrété du corps (Stevenson et Datta, 1998).



**Figure 2 : Représentation schématique d'un néphron**

Figure représentant un néphron avec son glomérule et son tubule. Le filtrat en provenance du glomérule passe dans la capsule de Bowman pour se retrouver dans le tubule contourné proximal, où l'absorption de l'eau et du sodium se produit. Il continue son chemin dans l'anse du néphron (anse de Henle) pour aller dans le tubule contourné distal. Le filtrat est concentré pour finalement se rendre dans le tubule collecteur et être excrété par l'uretère (Modifiée de Wikipédia, 2021).

#### *1.4.1.1 Tubule contourné proximal*

La première section du tubule se nomme le tubule contourné proximal et est en continuité avec le corpuscule rénal. Elle est composée d'une seule couche de cellules épithéliales composées de millions de microvillosités, augmentant ainsi la surface d'absorption

disponible pour les composés tels que l'eau et le sodium. La réabsorption du sodium est possible grâce à une pompe sodium-potassium au niveau des cellules épithéliales. L'augmentation des niveaux de sodium va créer un gradient favorisant l'entrée d'eau par osmose. Le gradient osmotique permet aussi la réabsorption d'autres ions comme l'hydrogénocarbonate ( $\text{HCO}_3^-$ ) qui permet de conserver un pH sanguin adéquat. Plusieurs produits sont sécrétés dans le tubule contourné proximal, comme des protons, l'ammoniac et plusieurs drogues et composés organiques, par exemple les sulfonamides et l'acide urique. Tout le glucose filtré est réabsorbé dans cette région grâce à des symporteurs sodium-glucose, notamment le *sodium-glucose transport proteins 1* (SGLT1) et le *sodium-glucose transport proteins 2* (SGLT2) (Stevenson et Datta, 1998).

#### 1.4.1.2 Anse du néphron

Cette section du tubule, qu'on appelle aussi l'anse de Henle, est composée de 2 parties qui vont avoir des propriétés spécifiques. Dans la partie descendante de l'anse, la paroi cellulaire est perméable à l'eau et celle-ci va être réabsorbée passivement en suivant un gradient de concentration causé par le liquide interstitiel hypertonique de la médulla. La section de l'anse est toutefois très peu perméable aux différents ions.

Dans la partie ascendante de l'anse du néphron, on retrouve la situation inverse. La paroi cellulaire est très peu perméable à l'eau, mais on assiste à la réabsorption d'ions de sodium et de chlore par diffusion facilitée. Plus haut dans la région ascendante, on retrouve des cellules épithéliales plus grosses qui possèdent plus de mitochondries et permettant alors un transport actif de sodium et de calcium du fluide tubulaire jusque dans le liquide interstitiel. C'est également dans la partie distale de cette région qu'on retrouve une structure épithéliale appelée *macula densa*, qui fonctionne comme un détecteur de chlorure de sodium pour réguler la filtration glomérulaire (Stevenson et Datta, 1998).

#### 1.4.1.3 Tubule contourné distal

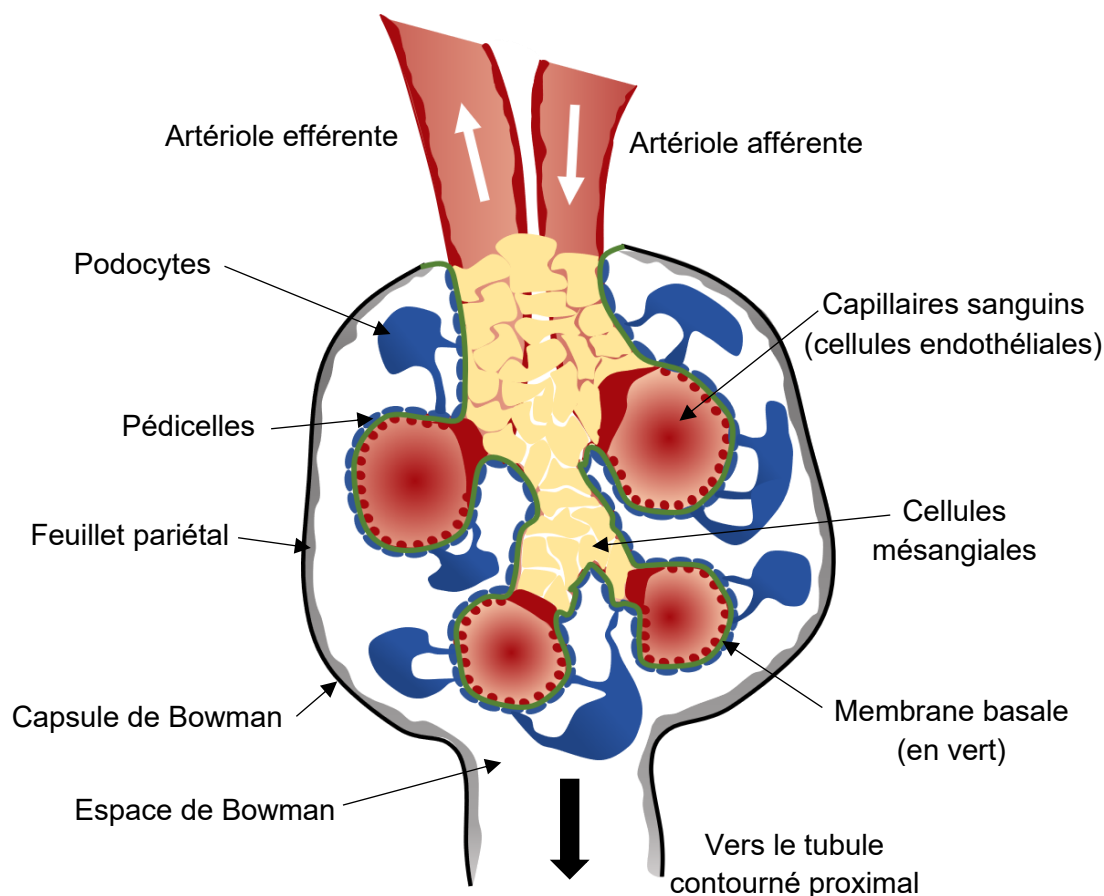
Le tubule contourné distal contient des symporteurs de sodium et de calcium sur la membrane apicale, permettant de réabsorber efficacement ces ions. Puisque cette section est également imperméable à l'eau, le processus permet la dilution de l'urine. Le tubule contourné distal participe à la sécrétion de potassium et à la régulation du pH via la sécrétion d'ions  $\text{H}^+$  et la réabsorption de  $\text{HCO}_3^-$  (Stevenson et Datta, 1998).

#### *1.4.1.4 Tubule rénal collecteur*

Le tubule rénal collecteur est l'endroit où la dernière transformation du filtrat en urine se produit. Le tubule est très long, partant du cortex rénal jusqu'au pelvis rénal. Dans cette région, l'épithélium est perméable à l'eau mais imperméable aux différents ions. Cette étape est cruciale pour la concentration des sels dans l'urine. Le liquide interstitiel possède maintenant une osmolarité élevée et l'urine excrétée sera hypertonique. La perméabilité du tubule collecteur est régulée par l'hormone antidiurétique, qui stimule la production d'aquaporines, des canaux perméables à l'eau, au niveau des cellules principales. On retrouve également des cellules intercalaires, responsables du maintien de l'homéostasie acide-base et sodium-chlore (Almomani *et al.*, 2014).

#### *1.4.2 Le glomérule*

Le glomérule est formé par l'invagination d'une boule de capillaires au niveau de la capsule de Bowman et est responsable de la filtration du sang en excréant les déchets métaboliques et les petites molécules, mais en retenant les protéines. Les capillaires sont capables de filtrer 125 mL de sang par minute et de supporter une grande pression. La barrière de filtration glomérulaire se compose de trois types de cellules : les cellules endothéliales, les cellules mésangiales et les podocytes (Figure 3).



**Figure 3 : Le glomérule**

Représentation schématique d'un glomérule en bonne santé. Le sang entre dans le glomérule par l'artériole afférente et ressort par l'artériole efférente. Les capillaires sanguins sont composés de cellules endothéliales. En jaune, les cellules mésangiales s'occupent du maintien et de la structure du glomérule en sécrétant du collagène pour former la membrane basale, en vert, qui permet de recouvrir les capillaires. Cette membrane est entourée de cellules qu'on appelle podocytes, représentées en bleu, et de leurs arborisations cytoplasmiques, les pédicelles (Modifiée de Quaggin, 2008).

#### *1.4.2.1 L'endothélium*

L'endothélium au niveau du glomérule est composé de cellules endothéliales et compose les capillaires. Les cellules endothéliales sont minces et allongées et contiennent de larges noyaux cellulaires. Ces capillaires sont fenestrés et contiennent des pores de 50 à 100 nm et sont responsables de la filtration la plus grossière du sang, en laissant circuler le plasma, mais en retenant les cellules sanguines et les plaquettes. L'albumine possède une taille d'environ 3,6 nm mais est tout de même retenue par le glomérule, suggérant que la filtration par les capillaires fenestrés ne se fait pas par exclusion de taille. En revanche, la charge

négative retrouvée sur le manteau des cellules endothéliales permet de retenir les molécules chargées négativement et ainsi contribuer à la perméabilité sélective du glomérule (Haraldsson *et al.*, 2008).

#### 1.4.2.2 *Le mésangium*

Le mésangium est responsable du maintien de la structure et du bon fonctionnement du glomérule. Il est composé des cellules mésangiales et de la matrice extracellulaire. Les cellules mésangiales entourent les capillaires et possèdent des caractéristiques de monocytes et de myocytes (Stevenson et Datta, 1998). Elles sécrètent la matrice extracellulaire, composée de collagène (type I, III, IV et V), de laminine, de fibronectine et de protéoglycanes, en plus d'avoir une activité phagocytaire. Les cellules mésangiales sécrètent également des facteurs de croissance comme le PDGF et l'IGF. Le mésangium est contractile, permettant ainsi de réagir à l'étirement, la déformation et la pression qu'il peut subir lors de la filtration (Riser *et al.*, 2001).

#### 1.4.2.3 *Les podocytes*

La couche de cellules épithéliales entourant les capillaires est formée de podocytes. Ceux-ci sont hautement spécialisés et sont responsables de la filtration la plus fine et la plus spécifique du sang. Les podocytes vont filtrer en fonction du poids moléculaire des protéines (Garg, 2019). Les podocytes sont composés de deux éléments structuraux et fonctionnels différents : un corps cellulaire et des extensions cytoplasmiques qu'on appelle « *main process* ». Ces extensions vont ensuite former d'autres extensions plus petites qu'on appelle des pédicelles, qui sont des structures ramifiées pouvant être interdigitées avec des pédicelles voisins pour former la barrière de filtration. Cette dernière filtration va laisser passer l'eau, les ions et certaines molécules selon leur poids et leur charge, car les pores formés par les jonctions serrées des pédicelles sont d'environ 5 nm (Jefferson *et al.*, 2011). C'est grâce aux pédicelles contenant la protéine  $\alpha 3 \beta 1$ , une protéine transmembranaire de la famille des intégrines, que les podocytes sont adhérents à la membrane basale du glomérule (Garg, 2019). Sans cette protéine, les podocytes sont plus à risque de se détacher de la membrane cellulaire et ainsi diminuer la filtration glomérulaire. À la surface des podocytes, on retrouve le glycocalyx qui offre une protection aux cellules en plus de contenir des molécules sulfatées comme des glycosaminoglycanes et la podocalyxine (Pavenstädt, 1998). À l'âge adulte, les

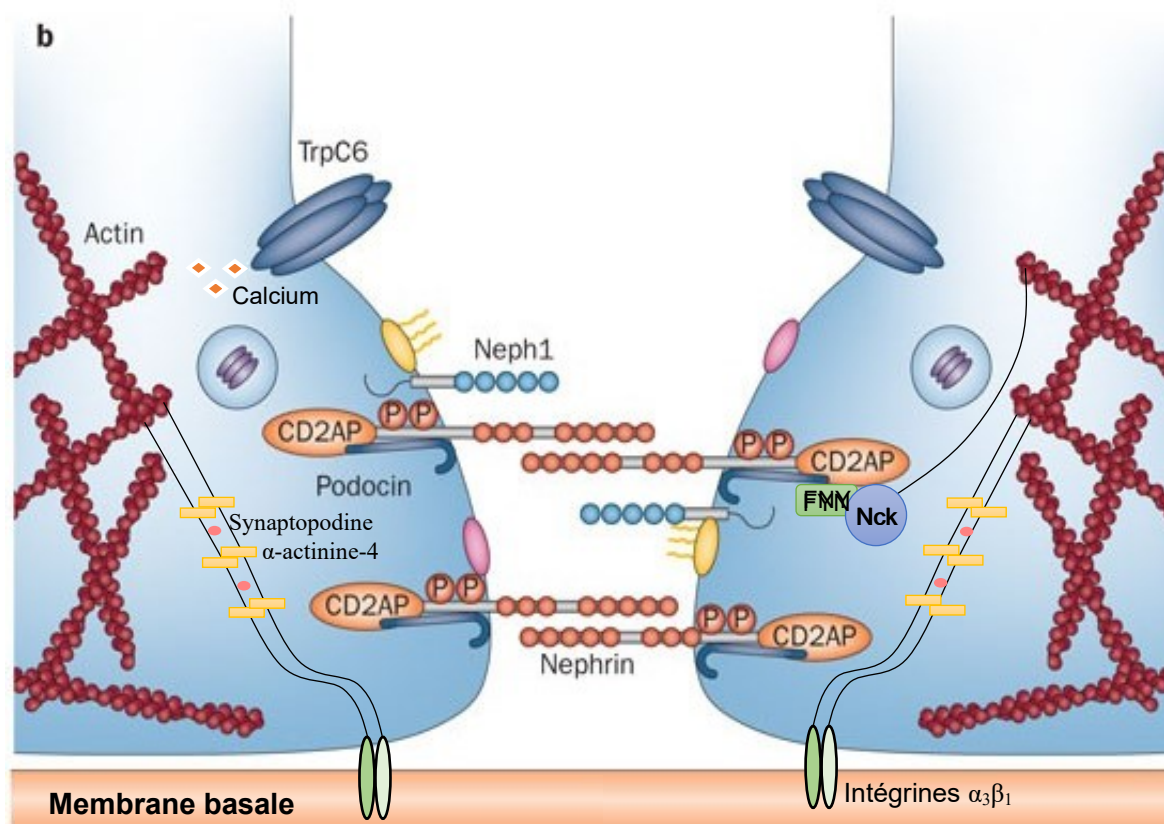
podocytes n'ont plus la capacité de se diviser et de se reproduire, ce qui fait qu'une diminution de leur nombre représente un bon signe clinique de dommages aux reins (Greka et Mundel, 2011).

### ***1.4.3 Les fentes de filtration***

Les fentes de filtration représentent la dernière barrière de filtration du rein, empêchant le passage de molécules avec un poids plus élevé que l'albumine. Ces fentes sont le résultat de plusieurs interactions protéiques entre les pédicelles, qui vont former une structure ressemblant à un complexe d'ancrage (Garg, 2019) (Figure 4). La région extracellulaire des fentes apparaît comme une structure en forme de fermeture éclair composée de tiges pouvant retenir les grosses protéines, mais laissant circuler librement les ions, l'eau et les plus petites molécules. L'attachement entre les différents pédicelles est possible grâce à plusieurs protéines, notamment néphrine, podocine et Neph1. Il a été démontré qu'une diminution des sialoprotéines du glycocalyx serait associée avec l'effacement des fentes de filtration, démontrant ainsi le rôle primordial de ces protéines dans la fonction rénale (Kerjaschki *et al.*, 1985).

Les protéines des fentes de filtration possèdent également un rôle de transduction de signal dans plusieurs voies métaboliques critiques pour les podocytes. Par exemple, l'entrée du calcium dans la cellule est possible grâce à la protéine *Transient receptor potential cation channel 6* (TRPC6). L'actine, le composant clé des pédicelles, peut également être remodelé avec des protéines de la famille des protéines adaptatrices de la région non catalytique des tyrosines kinases (*Non-catalytic region of tyrosine kinase adaptor protein*, NCK) (Jones *et al.*, 2006). Une autre voie importante est l'inhibition de l'apoptose via le phosphoinositide 3-kinase et la protéine kinase B (PI3K/Akt). La présence de mutations dans ces voies métaboliques cause plusieurs pathologies glomérulaires, illustrant donc l'importance du bon fonctionnement de ces voies dans les podocytes.





**Figure 4 : Schématisation des fentes de filtration des podocytes**

Les pédicelles des podocytes s'attachent à la membrane basale principalement grâce aux intégrines. Les fentes de filtration reliant les pédicelles de différents podocytes sont composées de nombreuses protéines qui participent à cette liaison ainsi qu'à plusieurs voies de signalisation primordiales pour la survie et le bon fonctionnement des podocytes. (Modifiée de Grahammer *et al.*, 2013)

### 1.5 Facteurs de dysfonction podocytaire

La néphropathie diabétique découle de la dédifférenciation et de l'apoptose des podocytes. Afin de mieux comprendre les processus menant au développement de la néphropathie, plusieurs équipes de recherche ont étudié différents facteurs qui pourraient expliquer ce dysfonctionnement podocytaire. Parmi ces nombreux facteurs, les plus importants semblent être une augmentation des produits de glycation avancée (*advanced-glycation end-products*, AGE), une production d'espèces réactives de l'oxygène (*reactive oxygen species*, ROS), une activation de certaines protéines kinases C, une diminution de la phosphorylation et d'expression de la néphrine et un défaut de signalisation de facteurs de croissance essentiels aux podocytes (Vasylyeva et Ferry, 2007).

### 1.5.1 Les produits de glycation avancée

Un excès de glucose sanguin peut induire plusieurs changements structuraux, tels que la formation accrue d'AGE. Les AGE sont formés par une réaction de sucres réducteurs avec des groupes aminés de protéines, de lipides ou d'acides nucléiques sans l'aide d'enzyme. Cette glycation rend les protéines plus rigides, moins modulables et plus propices à être modifiées. Il a été démontré que les produits de glycation avancée sont plus présents en hyperglycémie dans les podocytes et qu'ils pourraient dérégler l'autophagie, un processus nécessaire pour le bon recyclage des organelles et l'adaptation au stress (Zhao *et al.*, 2018). Une exposition chronique à des niveaux élevés de glucose peut également causer une production accrue de marqueurs pro-inflammatoires comme l'interleukine-6 (IL-6) et le facteur de nécrose tumorale alpha (*tumor necrosis factor alpha*, TNF- $\alpha$ ) lorsque les AGE se lient au récepteur des AGE (*receptor for advanced glycation end products*, RAGE). Ensemble, ces modifications participent à l'augmentation de la perméabilité vasculaire, à l'augmentation de la rigidité artérielle et à l'augmentation du stress oxydatif, résultant au développement de pathologies rénales comme la néphropathie diabétique (Parwani et Mandal, 2020).

### 1.5.2 Le stress oxydatif

Comme mentionné précédemment, les AGE vont participer à l'augmentation du stress oxydatif dans les podocytes. En combinaison avec le stress mécanique que l'hypertension provoque au niveau des reins, on assiste à une augmentation de la production des ROS dans le rein (Lewko et Stepinski, 2009). Les ROS sont étudiés depuis plusieurs années et sont connus pour favoriser l'apoptose des cellules en causant des dommages à l'ADN, aux protéines et à certains lipides. Pour ce qui est des podocytes, la voie pro-apoptotique p38 (*Mitogen activated protein kinase*, MAPK) est activée en présence des ROS, tout comme différentes caspases. Également, la voie PI3K/Akt est altérée par une augmentation des ROS, créant une augmentation de l'expression de Bax et de la caspase-3, des facteurs pro-apoptotiques importants (Cui *et al.*, 2019). Des inhibiteurs de ROS ont été étudiés dans des podocytes en culture et dans des souris avec une néphropathie diabétique. Dans les deux cas, l'apoptose des podocytes causée par l'hyperglycémie était diminuée et la voie PI3K/Akt était rétablie. Au niveau clinique, l'utilisation d'inhibiteur de ROS pour traiter des patients atteints de néphropathie diabétique est controversée depuis quelques années. En 2013, une étude

clinique randomisée du nom de BEACON (*Bardoxolone Methyl Evaluation in Patients with Chronic Kidney Disease and Type 2 Diabetes Mellitus : the Occurrence of Renal Events*) a été terminée avant la fin, puisque les patients ayant reçu le traitement de bardoxolone démontraient un risque plus élevé d'insuffisance cardiaque, d'infarctus du myocarde et de mortalité. Le bardoxolone est un agent antioxydant méthyle qui active fortement le facteur de transcription *nuclear factor erythroid-derived 2-like 2* (Nrf2) et semble causer une augmentation de l'albuminurie et du débit de filtration glomérulaire, signes d'une néphropathie diabétique. D'autres études restent encore à être réalisées afin de comprendre comment le stress oxydatif entraîne le développement de la néphropathie diabétique et comment il est possible de réduire efficacement et sécuritairement la production de ROS au niveau rénal (Chertow *et al.*, 2014).

### ***1.5.3 Les protéines kinases C***

Les PKCs sont des kinases pouvant phosphoryler en sérine et thréonine d'autres protéines pour moduler leur activité. On retrouve trois catégories de PKC, séparées selon leur mécanisme d'activation, mais étant toutes activées par la phosphatidylsérine. Les PKCs classiques, soit PKC $\alpha$ , PKC $\beta$  et PKC $\gamma$ , sont activés par le diacylglycérol (DAG) et le calcium ou par un ester de phorbol comme le phorbol 12-myristate 13-acétate (PMA, alors que les PKCs nouvelles, comme PKC $\epsilon$ , PKC $\eta$ , PKC $\theta$  et PKC $\delta$ , sont activées par le DAG ou le PMA. Pour PKC $\zeta$ , une PKC atypique, elle ne peut être activée par aucune de ces molécules (Geraldès et King, 2010). Des études ont déjà démontré qu'au niveau des podocytes, l'hyperglycémie peut activer PKC $\alpha$ , PKC $\beta$  et PKC $\delta$  et vont moduler des voies de signalisation pouvant engendrer des dommages aux podocytes. Des souris déficientes pour PKC $\alpha$  ont démontré une résistance au développement de l'albuminurie et à l'hyperfiltration glomérulaire produits par une augmentation de VEGF. L'inhibition de PKC $\beta$  semble aussi être positive, empêchant l'hypertrophie glomérulaire et l'hyperfiltration (Geraldès et King, 2010).

### ***1.5.4 Néphrine***

Néphrine est une protéine transmembranaire qui fait partie de la famille des *immunoglobuline-like*. On la retrouve uniquement dans les podocytes, plus précisément dans le complexe d'attachement interpédicelles au niveau des radeaux lipidiques de la membrane

cellulaire (Figure 4) (Ruotsalainen *et al.*, 1999). Cet ancrage entre les différents pédicelles se ferait possiblement par liaison homophile entre les domaines extracellulaires voisins et serait dépendant des résidus cystéines qu'on retrouve dans les motifs *IgG-like*, sans quoi une protéinurie importante pourrait se développer (Lenkkeri *et al.*, 1998). Le gène *NPHS1* est responsable de la production de la néphrine et une mutation dans ce gène est associée au syndrome néphrotique congénital, la forme la plus sévère de néphropathie. Cette découverte a démontré l'importance de la protéine dans le maintien de la fonction rénale (Petrakka *et al.*, 2000). Certains groupes de recherche ont récemment observé que la phosphorylation de la néphrine était primordiale pour le développement du glomérule, ce qui suggère que la protéine est importante non seulement au niveau des fentes de filtration, mais également dans la régulation de certaines voies de signalisation essentielles pour le développement du rein (Verma *et al.*, 2006). Parmi ces voies importantes, on retrouve le remodelage du cytosquelette d'actine et la signalisation de la voie anti-apoptotique PI3K/Akt (Jones *et al.*, 2006). Notre laboratoire étudie la néphrine depuis quelques années et nous avons démontré qu'il y a une diminution de l'expression de la néphrine dans le cortex rénal de souris diabétiques. De plus, ces souris présentent des caractéristiques suggérant une néphropathie diabétique (Denhez *et al.*, 2015).

### ***1.5.5 Hormones et facteurs de croissance***

Plusieurs hormones et facteurs de croissance sont essentiels au bon fonctionnement et à la survie des podocytes. Il est connu que certains de ces facteurs ont une signalisation altérée par une hyperglycémie chronique, augmentant de ce fait la dysfonction et l'apoptose des cellules. C'est le cas notamment pour des facteurs comme l'angiotensine II, le VEGF, l'insuline et l'IGF.

#### ***1.5.5.1 Angiotensine II***

L'angiotensine II (Ang II) est une composante majeure du système rénine-angiotensine et possède plusieurs rôles physiologiques. Ce peptide participe à la régulation de la pression artérielle et stimule la sécrétion d'aldostérone, provoque une vasoconstriction des artéioles dans le rein, augmente la réabsorption du sodium dans le tubule proximal, contribue à la relâche de l'hormone antidiurétique (ADH) et stimule la sensation de soif (Stevenson et Datta, 1998). L'angiotensine II est générée lorsque l'angiotensine I est convertie par

l'enzyme ACE. En condition d'hypertension au niveau rénal, Ang II est significativement augmenté et contribue à l'apoptose des cellules mésangiales et des podocytes (Berman *et al.*, 2013). Il a été démontré que la surexpression du récepteur de type 1 de l'angiotensine II (AT1R) dans les podocytes de rats provoque des dommages structuraux aux podocytes et dérègle l'attachement des pédicelles (Hoffmann *et al.*, 2004). L'activation de AT1R via l'angiotensine II provoque un stress au niveau du réticulum endoplasmique en augmentant l'expression des protéines GRP78, une protéine chaperonne, et de l'*Eukaryotic initiation factor 2* (eIF2 $\alpha$ ) ainsi que la phosphorylation de PKC $\delta$ . Il en suit une augmentation de la phosphorylation de la MAPK p38, une augmentation de l'expression de Bax et de l'activité du *sodium-hydrogen antiporter 1* (NHE1), déclenchant ainsi l'apoptose des podocytes (Cardoso *et al.*, 2018). L'Ang II affecte également les podocytes en empêchant la phosphorylation de la néphrine par la kinase Fyn, ce qui crée une désorganisation du cytosquelette d'actine (Yu *et al.*, 2013). En clinique, des bloqueurs du système rénine-angiotensine, tels que des antagonistes des récepteurs de l'angiotensine II et des inhibiteurs d'ACE, sont utilisés pour diminuer les dommages rénaux des patients (Roscioni *et al.*, 2014).

#### 1.5.5.2 VEGF

Il s'agit d'un facteur de croissance ayant plusieurs rôles au sein du rein, comme la survie cellulaire, la migration et la prolifération des cellules endothéliales. La cascade de signalisation se produit après la liaison du VEGF avec le récepteur VEGFR1 ou VEGFR2. Dans les glomérules, les podocytes sont responsables de la sécrétion du VEGF-A, une isoforme parmi les cinq connues, qui va permettre le maintien des capillaires dans le glomérule (Veron *et al.*, 2011). Dans un modèle murin où le VEGF est inhibé ou délété, une augmentation de l'apoptose des podocytes a été démontrée, en plus d'un effacement des fentes de filtration, d'une perte de cellules mésangiales et des fenestrations des cellules endothéliales et d'une albuminurie élevée. Ces souris présentent de nombreuses caractéristiques de la néphropathie diabétique, suggérant un rôle essentiel du VEGF dans la survie podocytaire et l'intégrité glomérulaire (Eremina *et al.*, 2008). Dans les premiers stades de la néphropathie diabétique, des niveaux élevés de VEGF sont observés, mais diminuent rapidement dans les stades avancés de la maladie. Cette perte de l'expression du VEGF corrèle avec une apoptose accrue des podocytes (Tung *et al.*, 2018).

#### 1.5.5.3 L'insuline

L'insuline est une protéine globulaire découlant de la proinsuline, elle-même formée d'une chaîne A, d'une chaîne B et d'un peptide C. Le clivage de cette protéine entraîne la formation de l'insuline et la libération du peptide C, l'insuline ayant un rôle important dans l'augmentation de l'*endothelial nitric oxide synthase* (eNOS) dans les cellules endothéliales (Luppi *et al.*, 2013). L'insuline est sécrétée par les cellules bêta du pancréas et nécessaire pour l'entrée du glucose dans plusieurs types de cellules, car elle permet la translocation de transporteurs de glucose à la membrane plasmique. L'insuline possède également un rôle dans la stimulation de la synthèse d'acide gras et de triglycérides et dans l'inhibition de la lipolyse dans le tissu adipeux pour réduire les niveaux plasmatiques d'acide gras (Dimitriadis *et al.*, 2011).

Les voies de signalisation de l'insuline sont essentielles à la survie podocytaire et au bon fonctionnement du glomérule. Un groupe de recherche a démontré l'importance de ces voies en utilisant des souris ayant une délétion du récepteur de l'insuline spécifiquement dans les podocytes. Ces souris non diabétiques développent une pathologie qui est similaire à la néphropathie diabétique, comme une albuminurie, une augmentation de la matrice extracellulaire, un épaississement de la membrane basale, une perte de morphologie ainsi que l'apoptose des podocytes. Au niveau des pédicelles, l'hypertrophie des podocytes provoque un changement au niveau de la structure des pédicelles et un effacement des fentes de filtration (Welsh *et al.*, 2010). La signalisation de l'insuline est étudiée depuis longtemps dans notre laboratoire. Une étude réalisée par notre équipe a démontré que l'hyperglycémie cause une inhibition des voies de signalisation de l'insuline dans les podocytes associée avec l'augmentation de la protéine tyrosine phosphatase *SH2 domain containing protein tyrosine phosphatase 1* (SHP-1) (Drapeau *et al.*, 2013). Une autre étude faite par notre laboratoire a observé que le palmitate, un acide gras, semble inhiber la signalisation de l'insuline dans les podocytes en favorisant la phosphorylation de l'*insulin receptor substrate 1* (IRS-1) en sérine 307, ce qui inhibe la cascade de signalisation et favorise la dysfonction podocytaire (Denhez *et al.*, 2020).

#### 1.5.5.4 *L'insulin-like growth factor*

L'IGF est un facteur de croissance qui possède une structure similaire à l'insuline et qui agit au niveau de plusieurs organes et participe à l'entrée de glucose dans les cellules au niveau périphérique, à la lipogenèse ainsi qu'à la synthèse de glycogène (Wittenbecher *et al.*, 2019). On retrouve deux isoformes d'IGF, soit IGF-1 et IGF-2. L'isoforme IGF-1, le plus étudié, agit au niveau des podocytes en augmentant la migration, la différenciation et la survie cellulaire. L'IGF-2, quant à lui, semble avoir un rôle moins bien compris au sein du glomérule. Au niveau du rein, les podocytes sont les cellules responsables de la sécrétion de la majorité des IGF, avec une production d'IGF-2 environ dix fois plus grande que d'IGF-1 (Hale *et al.*, 2013).

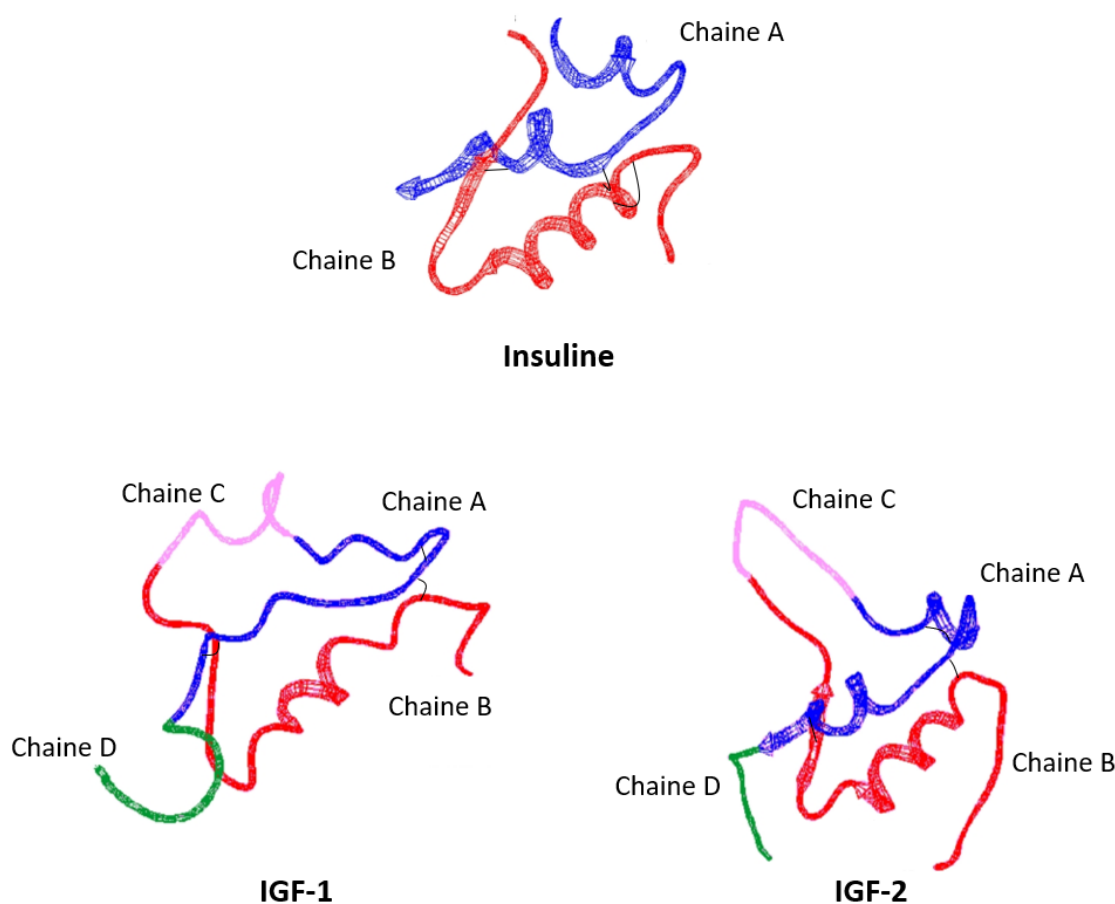
L'importance des IGFs dans la croissance et l'intégrité rénale a déjà été prouvée à maintes reprises. Chez des souris avec une délétion du gène pour IGF-1, il a été démontré que celles-ci naissent avec un poids plus faible que la normale alors que leurs reins sont significativement plus petits et possèdent un nombre moins élevé de néphrons. Une surexpression d'IGF-2 n'est pas suffisante pour compenser la perte de production d'IGF-1 et son impact sur la croissance de ces souris, démontrant le rôle important de l'IGF-1 dans le développement rénal. Au contraire, des souris qui vont surexprimer IGF-1 naissent avec un poids plus élevé et possèdent des reins et des glomérules plus gros que des souris contrôles, sans montrer de signes pathologiques (Bach et Hale, 2015). Chez les souris possédant une diminution de la production d'IGF-2, une protéinurie peut être observée après 18 mois d'âge, comparativement aux souris contrôles. Ces souris possèdent également des dommages aux glomérules, notamment une augmentation de la matrice extracellulaire, une expansion du mésangium ainsi qu'une dysfonction podocytaire. Ces résultats suggèrent qu'un dérèglement dans la signalisation de l'IGF peut avoir un impact non seulement sur les podocytes, mais également sur l'ensemble du glomérule et l'intégrité du rein.

### 1.6 Signalisation de l'IGF

Comme montré précédemment, les voies de signalisation de l'IGF ont une grande importance pour la survie des podocytes. Pour bien comprendre l'impact du diabète sur l'inhibition de la signalisation de l'IGF, il est primordial de connaître son mécanisme d'action en détail.

### 1.6.1 Les propriétés de l'IGF

Les IGFs sont des petites protéines d'environ 7 kDa qui agissent comme facteurs de croissance essentiels dans de nombreux processus biologiques. Ils font partie d'une famille de ligands qui comprend également l'insuline. Les 2 isoformes d'IGF ont une homologie d'environ 67% entre eux et d'environ 45-52% avec les chaînes A et B de l'insuline (Figure 5). De façon assez semblable à l'insuline, les IGFs possèdent également des ponts disulfures qui permettent de maintenir correctement le repliement de la protéine et la rendre fonctionnelle. Les fonctions des IGFs vont être médiées par la liaison des facteurs à des récepteurs transmembranaires tyrosine kinases (RTKs) (Osher et Macaulay, 2019).



**Figure 5 : Schématisation de l'insuline, l'IGF-1 et l'IGF-2**

L'insuline possède une homologie de 45-52% avec les IGFs, qui entre eux possèdent 67% d'homologie. Les trois hélices alpha de l'insuline, une dans la chaîne B (rouge) et deux dans la chaîne A (bleue), sont représentées ainsi que les structures équivalentes dans les IGFs. On retrouve les chaînes C et D dans les IGFs, respectivement en rose et en vert (Modifiée de Westley et May, 2013).



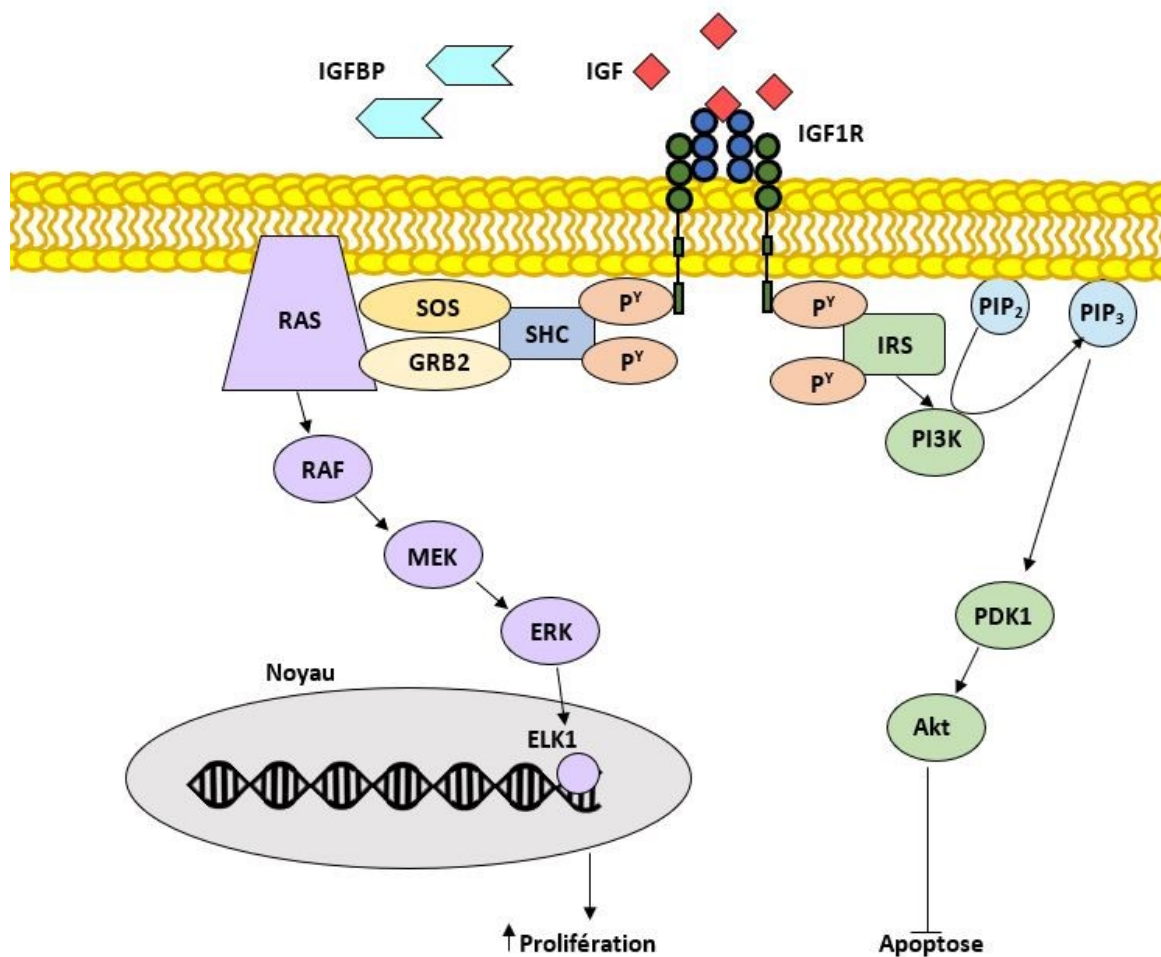
L'IGF-1 est produit majoritairement par le foie et est stimulé par l'hormone de croissance. Cette protéine est produite en grande quantité durant le développement fœtal, mais reste exprimée en plus faible quantité même à l'âge adulte. En plus du foie, l'IGF-1 peut être produit par de nombreux organes et agir de façon autocrine ou paracrine. Chez des patients diabétiques présentant une microalbuminurie, la production d'IGF-1 est perturbée et résulte en une diminution de l'effet protecteur d'IGF-1 contre l'apoptose des podocytes, les principaux producteurs d'IGF au niveau du rein (Vasylyeva et Ferry, 2007).

L'IGF-2, quant à elle, n'est pas dépendante de l'hormone de croissance pour sa production. Son niveau d'expression est régulé par plusieurs méthylations au niveau de l'ADN et son importance se trouve plutôt au niveau embryonnaire pour le développement normal du fœtus. Chez la souris mature, les niveaux systémiques d'IGF-2 sont indétectables, sauf au niveau des plexus choroïdes et des leptoméniges dans le cerveau. Chez l'homme, l'IGF-2 est cependant détectable dans plusieurs tissus, notamment le rein, et démontre un rôle important dans de nombreuses fonctions physiologiques (Hale *et al.*, 2013). Les niveaux circulants d'IGF-2 sont environ trois à quatre fois plus élevés que pour IGF-1 à l'âge adulte (Bach, 2018).

### ***1.6.2 Récepteurs à l'IGF et sa signalisation***

Le récepteur à l'IGF de type 1 (IGF1R) est un récepteur transmembranaire hétérotétramérique qui est constitué de deux sous-unités alpha extracellulaires identiques et deux sous-unités bêta transmembranaires (Laviola *et al.*, 2007). Le domaine transmembranaire contient une activité tyrosine kinase intrinsèque qui dépend d'un site de liaison à l'ATP à la lysine 1003 ainsi qu'un amas de trois résidus tyrosines en position 1131, 1135 et 1136. À la suite de la liaison du facteur de croissance au récepteur, il y a une autophosphorylation en tyrosine permettant la phosphorylation de plusieurs substrats cytoplasmiques pour activer les voies Ras-Raf-MEK-ERK et PI3K/Akt, responsables respectivement de la croissance et la survie cellulaire (Figure 6). En effet, même si l'IGF et l'insuline possèdent des actions distinctes, l'IGF peut augmenter les effets de l'insuline. Par l'activation de l'IGF1R, l'autophosphorylation du récepteur permet le recrutement d'IRS, qui sera à son tour phosphorylé pour ultimement activer Akt et réguler le métabolisme et

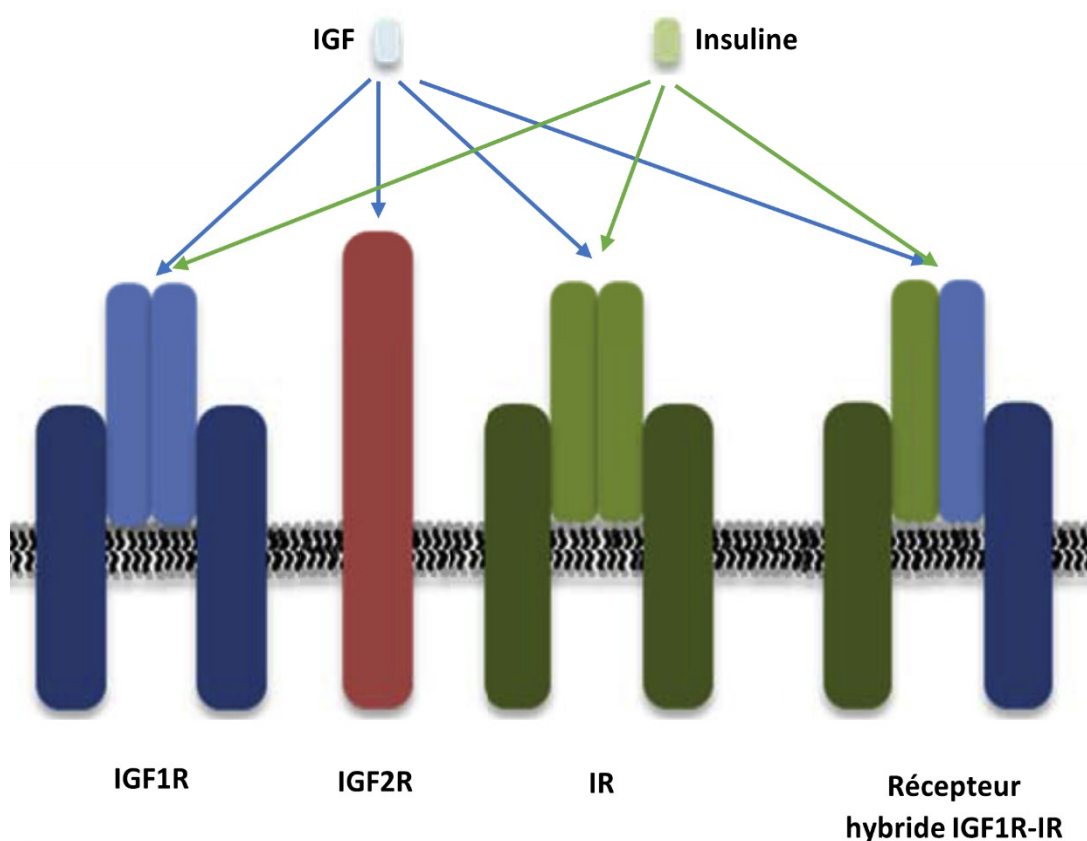
diminuer l'apoptose cellulaire, de façon similaire à la signalisation de l'insuline dans les podocytes (Figure 6) (Hale *et al.*, 2013).



**Figure 6 : La signalisation de l'IGF via le récepteur IGF1R**

Le récepteur IGF1R est une protéine tétramérique composée de deux sous-unités alpha et deux sous-unités bêta. Lorsque l'IGF se lie à son récepteur, on assiste à une autophosphorylation du récepteur, ce qui permet un site d'ancrage pour IRS qui sera phosphorylé à son tour et activera ultimement la protéine Akt et favoriser la survie cellulaire. La MAPK ERK est également activée par la liaison de l'IGF à son récepteur, via le recrutement de SHC, SOS et GRB2 pour former un complexe capable d'activer la voie Ras-Raf-MEK-ERK qui permet la croissance et la prolifération cellulaire (Adaptée de Haywood *et al.*, 2018).

On retrouve 3 isoformes de la protéine Akt : Akt1, Akt2 et Akt3. Ils possèdent une homologie entre eux d'environ 80% (Liao et Hung, 2009). Akt1 est activé par sa phosphorylation en Thr308 et en Ser473 via la voie PI3K qui se trouve en amont. Akt2 va plutôt être activé grâce à sa phosphorylation en Thr309 et en Ser474 alors que Akt3 est phosphorylé en Thr305 et en Ser472 (Aviv et Kirshenbaum, 2010). Au niveau des podocytes, la protéine Akt a été démontrée comme étant essentielle au maintien d'une bonne fonction rénale. La délétion de Akt2 engendre des problèmes similaires à ceux retrouvés dans la néphropathie diabétique (Canaud *et al.*, 2013).



**Figure 7 : Les différents récepteurs de l'IGF**

On retrouve 4 récepteurs différents dans l'axe de l'IGF : Le récepteur IGF1R, le récepteur IGF2R, le récepteur à l'insuline et un récepteur hybride. Les 2 isoformes d'IGF et l'insuline vont lier les différents récepteurs avec différentes affinités. L'IGF1R lie de façon préférentielle l'IGF1 et peut également lier l'IGF2 et l'insuline avec moins d'affinité. L'IGF2R lie majoritairement l'IGF2 et un peu l'IGF1, mais pas l'insuline. Les IGFs vont lier faiblement le récepteur à l'insuline tandis que le récepteur hybride IGF1R-IR va lier fortement les IGFs, mais faiblement l'insuline. Toutes ces interactions vont créer différentes réponses cellulaires importantes pour la survie podocytaire (Modifiée de Haywood *et al.*, 2018).

En ce qui a trait à la voie des kinases MAPK MEK-ERK, elle est généralement connue pour être impliquée dans la prolifération et la croissance cellulaire (Figure 6). Cette voie ne passe pas par l'activation de PI3K, mais par le recrutement de protéines comme *Src homology 2 domain containing* (SHC), *son of sevenless* (SOS) et *Growth factor receptor-bound protein 2* (GRB2) qui vont former un complexe afin de lier la protéine Ras et activer la cascade de signalisation Ras-Raf-MEK-ERK pour la prolifération (Kolch, 2000).

Outre l'IGF1R, les IGFs peuvent lier d'autres récepteurs transmembranaires (Figure 7). En effet, il existe une grande homologie entre le récepteur IGF1R et le récepteur à l'insuline (IR), particulièrement dans le domaine tyrosine kinase où l'homologie est de 84% (Laviola *et al.*, 2007). Lorsque les IGFs et l'insuline sont en concentration élevée, l'insuline peut lier l'IGF1R et vice-versa. Ces deux récepteurs sont grandement exprimés dans plusieurs tissus et peuvent former un récepteur hybride qui possède une faible affinité pour l'insuline (Haywood *et al.*, 2018). De façon préférentielle, l'IGF1R va lier l'isoforme IGF-1, mais peut également lier l'IGF-2 et l'insuline avec une affinité 10 fois et 100 fois plus faible respectivement. Ces trois facteurs de croissance ont la capacité de se lier au récepteur à l'insuline, avec une affinité plus élevée pour l'insuline que les IGFs. De façon intéressante, le récepteur hybride, quant à lui, peut lier avec une forte affinité les deux isoformes de l'IGF, alors que l'insuline ne peut interagir fortement avec celui-ci. La majorité des effets biologiques des IGFs observés sur la croissance cellulaire, la différenciation et la survie cellulaire dépendent donc de l'activation du récepteur IGF1R et de sa signalisation qui partage plusieurs médiateurs intracellulaires avec la signalisation de l'insuline.

Moins connu, le récepteur à l'IGF de type 2 (IGF2R) est identique au récepteur cation indépendant mannose-6-phosphate. Ce récepteur est capable de lier fortement IGF-2 comparativement à l'IGF-1, pour qui il a une affinité environ 500 fois plus faible. L'IGF2R ne peut également pas se lier avec l'insuline. La majorité de l'IGF-2 circulant se lie au récepteur IGF1R malgré tout afin de médier à ses actions métaboliques. De plus en plus d'études démontrent que l'IGF2R fonctionnerait majoritairement comme un récepteur éboueur, permettant de réguler l'internalisation et la dégradation de l'IGF-2 extracellulaire et ainsi contrôler les niveaux circulants du facteur de croissance (Oh, 2011). Il a été démontré que chez des patients souffrant d'obésité modérée et de diabète de type 2, l'expression du

récepteur IGF2R est augmentée significativement, suggérant un rôle de la diète dans l'expression du récepteur (Haywood *et al.*, 2018).

La signalisation de l'IGF est régulée également de façon plus complexe au niveau cellulaire par une famille de six protéines de liaison qui viennent empêcher l'interaction de l'IGF avec un récepteur. Ces protéines de liaison s'appellent les *insulin-like growth factor binding proteins* (IGFBPs) et l'isoforme IGFBP2 sera détaillé davantage dans ce mémoire.

## 1.7 Les protéines de liaison

### 1.7.1 Les protéines de liaison dans les podocytes

Une façon efficace de contrôler la voie de signalisation des différents récepteurs de l'IGF est d'empêcher la liaison du substrat à ses récepteurs. Les protéines de liaison des IGFs sont des protéines d'environ 40 kDa ayant la capacité de lier les deux isoformes d'IGF afin de contrôler leur signalisation et leurs effets métaboliques en bloquant leur accès aux récepteurs. Les IGFs possèdent une affinité environ dix fois plus élevée avec les IGFBP qu'avec l'IGF1R, leur principal récepteur, favorisant ainsi la formation d'un complexe IGF-IGFBP. Les protéines de liaison ne peuvent toutefois pas lier l'insuline et impacter sa liaison aux différents récepteurs. Un total de six protéines de liaison ont été identifiées chez l'humain, allant de IGFBP1 à IGFBP6 (Oh, 2011). Ces différentes protéines possèdent une grande affinité pour les IGFs et partagent une homologie d'environ 50% entre eux, dont 16-18 résidus cystéines conservés dans leurs régions NH<sub>2</sub>-terminal et COOH-terminal (Fujinaka *et al.*, 2010). Ces deux régions sont essentielles et permettent une grande affinité avec les IGFs. Les IGFBPs sont majoritairement produits au niveau du foie, mais peuvent également être produits plus localement par plusieurs autres organes. L'IGFBP1 se distingue des autres IGFBP par sa régulation dynamique qui se fait majoritairement en fonction de l'alimentation, modifiant ainsi les niveaux d'insuline. L'IGFBP1 possède un élément de réponse à l'insuline dans sa région promotrice, permettant à l'insuline d'inhiber l'expression d'IGFBP1. À jeun, les niveaux circulants d'IGFBP1 sont élevés et stimulés par le cortisol et le glucagon (Haywood *et al.*, 2018). L'isoforme IGFBP3 est le plus étudié à ce jour et est également l'isoforme le plus présent dans la circulation, permettant la liaison d'environ 90% des IGFs. Il a été démontré que l'IGFBP3 réduit l'entrée de glucose dans les cellules indépendamment de sa liaison avec les IGFs dans les adipocytes. Elle peut également induire la production de

TNF- $\alpha$  et participer au développement de l'obésité et de la résistance à l'insuline. Peu d'études ont été réalisées sur l'isoforme IGFBP4, mais la protéine semble avoir un seul rôle : lier les IGFs et contrôler leur signalisation. L'hyperglycémie cause un clivage accru de la protéine qui se retrouve alors en très faible quantité dans le corps (Haywood *et al.*, 2018). En ce qui concerne IGFBP5, la protéine est diminuée chez les individus atteints de diabète de type 1 et de type 2. Chez ces personnes, lorsqu'une augmentation des niveaux circulants d'IGFBP5 est observée, il s'agit d'un signe de complications vasculaires, notamment d'une faible capacité de guérir une plaie et de fibrose cardiaque. Les niveaux d'IGFBP5 sont également plus élevés chez les femmes enceintes souffrant de diabète gestationnel que chez les femmes avec une grossesse normale (Haywood *et al.*, 2018). L'isoforme IGFBP2 est très importante et sera abordée davantage dans les prochaines sections.

Un groupe de recherche a récemment étudié l'expression en ARNm des différents IGFBPs dans des glomérules humains, connus pour produire les différents IGFBPs de façon locale. En mesurant l'expression génique par PCR, ils ont déterminé que l'isoforme IGFBP2 était le plus fortement exprimé au niveau du glomérule. Plus précisément, par la technique d'hybridation *in situ* (ISH), le type cellulaire au niveau glomérulaire responsable de la plus grande production d'IGFBPs a aussi été identifié. On les retrouve principalement au niveau des podocytes, de la même façon que les IGFs et les récepteurs à l'IGF. Ces résultats ont également été observés dans des glomérules de rats en santé et démontrant une glomérulonéphrite (Fujinaka *et al.*, 2010).

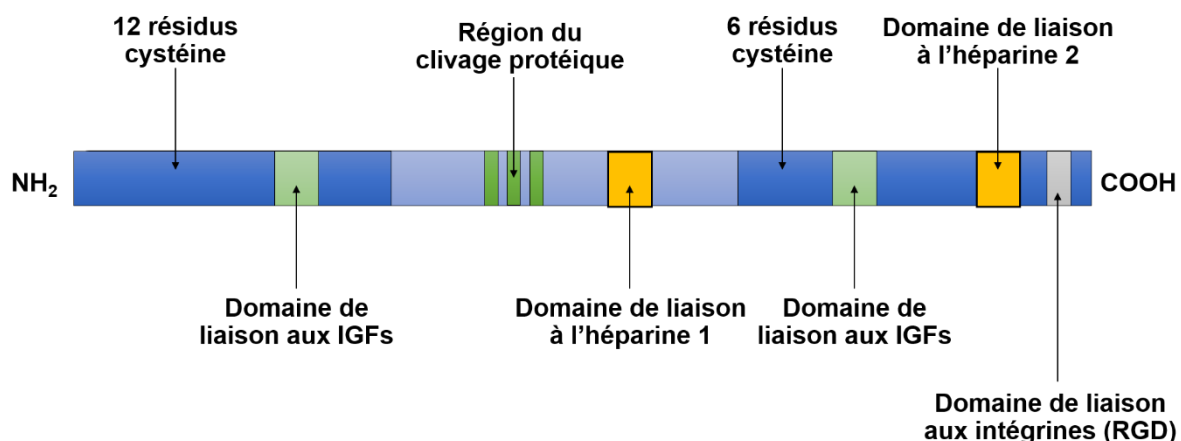
### ***1.7.2 Rôle des protéines de liaison dans la signalisation de l'IGF***

En plus de lier fortement les différents IGFs et d'empêcher la liaison à leurs différents récepteurs, les IGFBPs peuvent également avoir des effets stimulateurs sur la signalisation de l'IGF. En effet, presque l'entièreté (99%) des IGFs est liée aux IGFBPs, puisqu'ils permettent de prolonger leur demi-vie et d'empêcher leur dégradation protéolytique pour ainsi augmenter la concentration locale d'IGF. Afin de libérer les IGFs de cette liaison, un clivage protéique ou la liaison de l'IGFBP avec un glycosaminoglycane associé à la cellule est nécessaire. Lorsque les IGFs sont libres dans la circulation, ceux-ci possèdent une demi-vie de seulement 10 minutes, réduisant grandement leur capacité à activer les voies de signalisation importantes au bon fonctionnement de l'organisme. Le complexe formé IGF-IGFBP possède quant à lui une demi-vie approchant les 30 minutes, rendant cette liaison

importante pour la signalisation et la survie de l'IGF. Certaines protéines de liaison, comme l'IGFBP3, peuvent former un complexe tertiaire d'environ 150 kDa en se liant à la fois avec un IGF, mais également avec une sous-unité labile aux acides (ALS) et augmentant la demi-vie des IGFs à 15 heures. L'importance de ce complexe a été démontrée chez des patients possédant une mutation de l'ALS qui présentaient des niveaux significativement réduits d'IGF-1 et d'IGFBP3. D'autres études ont également démontré que la liaison IGF-IGFBP permettait de diriger le complexe dans des compartiments extracellulaires spécifiques dans différents tissus, mais les mécanismes rendant cette spécialisation possible sont encore peu étudiés (Bach, 2018).

### ***1.7.3 L'IGFBP2***

Au niveau des podocytes, l'IGFBP2 est l'isoforme le plus exprimé et le plus intéressant à étudier dans le cadre de mon projet. Il s'agit d'une protéine de 36 kDa encodée par le gène *IGFBP2* présent sur le chromosome 2 dans la région q33-q34. Comparativement à certains autres IGFBPs, l'isoforme IGFBP2 ne peut pas être glycosylé ou phosphorylé et peu d'informations sont disponibles en ce qui a trait aux modifications post-traductionnelles. Cette protéine se lie préférentiellement à l'IGF-2 et possède une structure intéressante contenant plusieurs domaines de liaison (Haywood *et al.*, 2018).



**Figure 8 : Structure de l'IGFBP2**

Pareillement aux autres IGFBPs, l'IGFBP2 possède 3 régions structurales : Un domaine N-terminal riche en résidus cystéine (12 résidus), un domaine central de liaison et un domaine C-terminal avec 6 résidus cystéine. On retrouve deux domaines de liaison aux IGFs dans les extrémités. Le domaine central contient une région où se produit le clivage protéique. L'IGFBP2 possède aussi deux domaines de liaison à l'héparine, dans la région centrale et en C-terminal, en plus d'un domaine de liaison aux intégrines dans la dernière région (Adaptée de Russo *et al*, 2014).

#### 1.7.3.1 Structure et activation

L'IGFBP2 possède un domaine NH<sub>2</sub>-terminal, un domaine central de liaison ainsi qu'un domaine COOH-terminal (Figure 8). Dans la région N-terminale, on retrouve 12 résidus cystéines conservées entre les différentes isoformes d'IGFBPs ainsi qu'un domaine de liaison aux IGFs, avec une préférence pour l'IGF-2. Dans le domaine central de liaison, on retrouve la région où le clivage protéique permettant de libérer les IGFs se produit ainsi qu'un domaine de liaison à l'héparine. Ce dernier différencie l'IGFBP2 des autres protéines de liaison, puisque ceux-ci ne possèdent aucun ou ne possèdent qu'un seul domaine de liaison à l'héparine dans la région C-terminale. On retrouve un deuxième domaine de liaison aux IGFs dans la région C-terminale de la protéine ainsi que 6 résidus cystéines conservés. Lorsque l'IGFBP2 subit un clivage protéique, les deux domaines de liaison ont une affinité altérée pour les IGFs, suggérant que les deux domaines sont nécessaires pour produire une interaction forte avec les facteurs de croissance. Une analyse plus complète de la région C-terminale a démontré que son domaine de liaison aux IGFs possède un rôle primordial, puisqu'il lie les IGFs à une région qui est impliquée dans la liaison de la protéine à son récepteur et prévient donc son activation (Russo *et al.*, 2015).

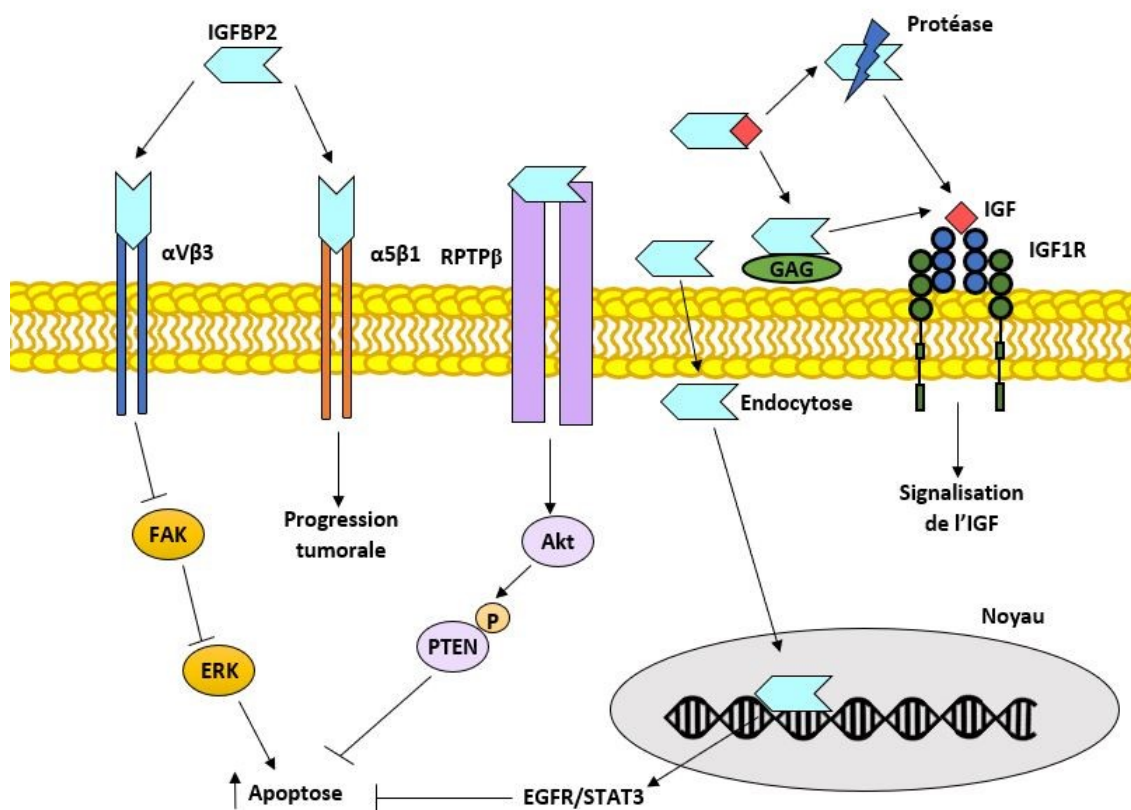


Pareillement à l'IGFBP1, l'IGFBP2 possède une séquence Arginine-Glycine-Asparagine (RGD) en position 265-267 chez l'humain. Cette séquence se retrouve sur plusieurs protéines de la matrice extracellulaire et contribue à son adhésion à des récepteurs cellulaires qu'on appelle les intégrines, notamment les intégrines  $\alpha V\beta 3$  ou  $\alpha 5\beta 1$ , ce qui permet à l'IGFBP2 de médier plusieurs actions indépendantes aux IGFs.

Le domaine de liaison à l'héparine (HBD) dans la région centrale de la protéine représente une séquence consensus pour la reconnaissance des glycosaminoglycanes. La séquence PKKLRP se trouve aux résidus 179-184 chez l'humain et permet à la protéine de se lier au récepteur de protéines tyrosines phosphatases bêta (RPTP $\beta$ ) et bloquer son activité phosphatase (Russo *et al.*, 2015). Un deuxième domaine HBD a été découvert dans la région C-terminale de la protéine. Ce domaine est dépendant du pH, puisque la protonation de deux résidus histidine en position 228 et 271 est nécessaire pour l'activation du domaine, qui se produit à un pH environnant de 5.5-6.0 et est désactivé à 7.4 (Russo *et al.*, 2015).

#### 1.7.3.2 Actions indépendantes à l'IGF

Outre empêcher la liaison des IGFs à leurs récepteurs et augmenter leurs demi-vies, l'IGFBP2 possède aussi des actions qui ne sont pas dépendantes des facteurs de croissance (Figure 9). Ces actions sont possibles grâce aux nombreux domaines d'interactions permettant la liaison de la protéine à la matrice extracellulaire et la membrane cellulaire. Comme mentionné plus tôt, l'IGFBP2 possède un domaine de liaison aux intégrines qui contient le motif RGD. Les effets engendrés par l'interaction de l'IGFBP2 aux intégrines  $\alpha V\beta 3$  ou  $\alpha 5\beta 1$  sont encore controversés, dépendamment du type cellulaire. Dans des cellules cancéreuses MCF-7, l'interaction d'IGFBP2 avec l'intégrine  $\alpha V\beta 3$  permet de diminuer la croissance tumorale. Dans des cellules cancéreuses de type Hs578T, la liaison de l'IGFBP2 à l'intégrine provoque une déphosphorylation de la *Focal Adhesion Kinase* (FAK) et de la MAPK ERK, réduisant la prolifération cellulaire et augmentant l'activité pro-apoptotique dans les cellules (Pereira *et al.*, 2004). Inversement, dans des tumeurs gliales, l'interaction entre IGFBP2 et  $\alpha 5\beta 1$  active la motilité des cellules et participe à la progression de la tumeur. Dans une autre étude, l'interaction d'IGFBP2 avec  $\alpha 5\beta 1$  semble provoquer une suppression de la protéine *Phosphatase and TENsin homolog* (PTEN) dans les cellules cancéreuses MCF-7, protégeant ces cellules contre la mort cellulaire induite par la chimiothérapie (Foulstone *et al.*, 2013).



**Figure 9 : Les actions cellulaires de l'IGFBP2**

L'IGFBP2 contrôle la biodisponibilité des IGFs aux récepteurs et ceux-ci peuvent être libérés par une protéase spécifique à l'IGFBP2 ou la liaison avec un GAG. L'IGFBP2 possède également des actions intracellulaires possibles par l'interaction de la protéine avec des composants de la matrice extracellulaire, comme des intégrines ( $\alpha V\beta 3$  et  $\alpha 5\beta 1$ ) et des récepteurs de protéines tyrosines phosphatases (RPTP $\beta$ ). L'IGFBP2 peut également entrer dans la cellule par endocytose et se rendre au noyau afin d'activer des voies de signalisation favorables à la tumorigenèse (Adaptée de Russo *et al.*, 2015).

Les domaines de liaison à l'héparine de l'IGFBP2 permettent aussi à la protéine de lier la matrice extracellulaire et interagir avec le récepteur RPTP $\beta$ , créant sa dimérisation. Cette liaison cause une augmentation de la phosphorylation de la protéine PTEN, inhibant ses actions et permettant ainsi l'activation de la voie PI3K/Akt qui est favorable à la survie cellulaire. Des niveaux circulants élevés d'IGFBP2 sont associés avec une diminution de l'activité de PTEN dans certains cancers agressifs. Au niveau de la croissance cellulaire, la liaison avec le récepteur RPTP $\beta$  augmente la différenciation normale des ostéoblastes par une régulation biphasique de l'*AMP-activated protein kinase* (AMPK) et de l'autophagie

(Bach, 2018). Au niveau du domaine central de liaison, on retrouve une séquence de localisation nucléaire qui permet à la protéine d'aller réguler différentes voies de signalisation nucléaires, notamment la voie *epidermal growth factor receptor/Signal transducer and activator of transcription 3* (EGFR/STAT3), favorisant la migration et la survie des cellules cancéreuses dans des tumeurs gliales. Malgré ces nombreuses actions indépendantes à l'IGF, les recherches entourant IGFBP2 au niveau des podocytes sont peu nombreuses (Russo *et al.*, 2015).

#### *1.7.3.3 Rôle d'IGFBP2 dans le diabète et ses complications*

La protéine IGFBP2 semble également avoir un rôle dans le développement du diabète et de ses complications. Dans un modèle de souris obèse, la surexpression du gène *Igfbp2* a démontré une amélioration de la résistance à l'insuline, favorisant ainsi l'entrée de glucose dans les cellules. Dans cette étude, des souris de type ob/ob, qui possèdent un défaut du gène codant pour la leptine et souvent utilisé comme modèle d'obésité et de diabète de type 2, ont été traitées à plusieurs concentrations de leptine afin de déterminer la dose minimale permettant de réduire les niveaux de glucose et d'insuline dans le sang. Après avoir déterminé cette dose de 25 ng/h, l'équipe de recherche a découvert qu'IGFBP2 était régulée positivement par les niveaux de leptine. La surexpression d'IGFBP2 par le foie par un adénovirus a augmenté les niveaux sanguins de la protéine et a renversé le diabète et la résistance à l'insuline dans un modèle de souris ob/ob, mais également dans un modèle Ay/a et un modèle de souris obèse avec une diète riche, deux autres modèles utilisés pour étudier le diabète de type 2. L'adénovirus a également eu les mêmes effets dans un modèle de souris diabétiques de type 1 créé par l'injection de streptozotocine (Hedbacker *et al.*, 2010). L'IGFBP2 semble améliorer le métabolisme du glucose et agir en aval de la signalisation de la leptine dans le corps. Ces résultats suggèrent également un rôle indépendant de la protéine à la signalisation de l'insuline et de l'IGF, puisqu'IGFBP2 normalise les niveaux de glucose sanguin dans le modèle STZ où l'insuline est absente.

Une étude clinique a observé que des niveaux circulants élevés d'IGFBP2 étaient associés avec une diminution de l'indice de masse corporelle (IMC), du tour de taille, de l'index de foie gras (FLI) et du risque de développer le diabète de type 2 (Wittenbecher *et al.*, 2019). En plus d'avoir des effets directs par les niveaux circulants, la protéine IGFBP2 pourrait potentiellement avoir un rôle dans l'origine du développement du diabète de type 2, puisque

la protéine semble impliquée dans l'obésité infantile. En effet, l'IGFBP2 est la protéine de liaison la plus exprimée durant l'enfance et la plus exprimée au niveau des adipocytes, suggérant un rôle important dans le développement de complications à long terme (Sabin *et al.*, 2011). Des variations épigénétiques ont également démontré qu'IGFBP2 est lié à l'accumulation de graisse au niveau du foie, autant chez la souris que chez l'humain. Ces recherches suggèrent qu'une déficience de la protéine IGFBP2 est favorable à la prise d'adiposité viscérale et l'accumulation de lipides au niveau du foie, deux facteurs de risque du développement du diabète de type 2.

### **Hypothèse/Problématique**

En collaboration avec le Dr Picard de l'Université Laval et le Dr McGavock de l'Université du Manitoba, nous avons récemment découvert que les niveaux circulants de la protéine IGFBP2 étaient réduits d'environ 33% chez des adolescents obèses diabétiques comparativement à des adolescents obèses non-diabétiques. Cette diminution corrèle avec une augmentation de l'albuminurie ainsi que d'autres marqueurs inflammatoires, suggérant une atteinte rénale avancée. L'axe IGF-IGFBP2 est de plus en plus considéré comme une voie de signalisation importante dans le contrôle glycémique et le métabolisme. Bien que les podocytes expriment IGFBP2 de façon locale, son rôle exact dans la fonction podocytaire et le développement de la néphropathie diabétique reste à déterminer.

### **Objectifs**

Les objectifs de cette étude étaient :

1. De caractériser l'expression d'IGFBP2 dans la voie de signalisation de l'IGF et de l'insuline dans des podocytes exposés à des concentrations élevées de glucose et/ou en présence d'acides gras saturés (palmitate),
2. D'étudier le rôle d'IGFBP2 dans le développement de la néphropathie diabétique dans un modèle murin de diabète de type 1 surexprimant IGFBP2 ou déficiente pour IGFBP2.

## MATÉRIELS ET MÉTHODES

### 2.1 Expérimentations chez la souris

Six différents groupes de souris ont été utilisés dans mon projet de recherche. Toutes les souris utilisées sont de souche C57BL/6, un modèle grandement utilisé dans la recherche sur les maladies humaines pour sa facilité à se reproduire et à être génétiquement modifiée. Le sixième des souris possède une surexpression dans tout le corps de la protéine IGFBP2 (*Igfbp2<sup>TG</sup>*) et un autre sixième possède la surexpression d'IGFBP2 en plus du diabète de type 1 (*Ins2<sup>+C96Y</sup> Igfbp2<sup>TG</sup>*). Un autre sixième des souris est déficient dans tout le corps pour la protéine IGFBP2 (*Igfbp2<sup>-/-</sup>*) et le dernier sixième comprend des souris déficientes pour IGFBP2 ainsi que le diabète de type 1 (*Ins2<sup>+C96Y</sup> Igfbp2<sup>-/-</sup>*). Des souris sauvages non-diabétiques NDM (*Ins2<sup>+/+</sup>*) et diabétiques DM (*Ins2<sup>+C96Y</sup>*) ont servi comme groupes contrôles. Au total, les six groupes sont : Les souris sauvages NDM, les sauvages DM, les *Igfbp2<sup>TG</sup>* NDM, les *Igfbp2<sup>TG</sup>* DM, les *Igfbp2<sup>-/-</sup>* NDM et les *Igfbp2<sup>-/-</sup>* DM (Tableau 1). Pour le modèle de diabète de type 1, il s'agit du modèle Akita qui est efficace pour l'étude des complications vasculaires du diabète telles que la néphropathie diabétique. Les souris Akita sont caractérisées par une mutation dans le gène *Ins*. Elles possèdent une substitution de la cystéine 96 pour une tyrosine, créant ainsi un mauvais repliement de la protéine de l'insuline. Cette déformation rend la protéine non fonctionnelle et le mauvais repliement va être reconnu par le système immunitaire de la souris, ce qui va causer la dégradation des cellules bêta des îlots de Langerhans du pancréas. Les souris développent un diabète de type 1 après 4 semaines d'âge et aucune répercussion sur la croissance et le développement de la souris n'est observable. Les souris ont été surveillées et les changements de cage réalisés par les techniciennes de l'animalerie de la Faculté de médecine et des sciences de la santé de l'Université de Sherbrooke. Elles ont également eu un libre accès à de la nourriture et à de l'eau pour la durée totale de leur vie avant d'être euthanasiées à 7 mois d'âge. Tous les protocoles éthiques impliquant des manipulations sur les animaux nécessaires à mon projet ont été évalués et approuvés par le comité d'éthique animal de l'Université de Sherbrooke.

**Tableau 1 : Liste des six différents groupes de souris**

<i>Ins2<sup>+/+</sup></i>	<i>Ins2<sup>+/C96Y</sup></i>	<i>Ins2<sup>+/+</sup></i> <i>IGFBP2<sup>TG</sup></i>	<i>Ins2<sup>+/C96Y</sup></i> <i>IGFBP2<sup>TG</sup></i>	<i>Ins2<sup>+/+</sup></i> <i>IGFBP2<sup>-/-</sup></i>	<i>Ins2<sup>+/C96Y</sup></i> <i>IGFBP2<sup>-/-</sup></i>
---------------------------	------------------------------	---	--	--	---

### **2.1.1 Mesure de la glycémie à jeun**

La glycémie représente la quantité de glucose dans le sang. La glycémie des souris a été mesurée à 5 et 7 mois d'âge. Les souris ont été mises à jeun pour une durée minimale de 6 heures avant de prendre les mesures. Une aiguille 27G est utilisée pour atteindre la veine caudale et y faire sortir une goutte de sang que l'on place sur une bandelette de lecture compatible avec un glucomètre (*Contour Next*) permettant de mesurer la glycémie des souris à jeun. Les valeurs ont été mesurées en mmol/L et converties en mg/dL.

### **2.1.2 Quantification de l'albumine urinaire**

La mesure de la quantité d'albumine dans l'urine s'appelle l'albuminurie. Pour évaluer ce paramètre chez les souris, l'urine a été collectée sur une période de 24 heures grâce à des cages métaboliques (modèle 650-0311; Nalgene Nunc International, Rochester, NY, États-Unis) permettant de séparer l'urine et les excréments en 2 compartiments distincts. Les souris avaient libre accès à l'eau et la nourriture durant ces 24 heures de récolte. Les niveaux d'albumine urinaire ont ensuite été détectés à l'aide de la trousse *Albuwell M* de *Exocell* (cat# 1101). Il s'agit d'un ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) de compétition directe. Cinquante µL de l'échantillon d'urine ont été ajoutés et incubés durant 30 minutes avec l'anticorps primaire anti-albumine fourni dans la trousse. Dix lavages à l'eau distillée ont été effectués et l'anticorps secondaire couplé à HRP (*horseradish peroxidase*) a ensuite été ajouté dans le puits pour 30 minutes. Dix autres lavages à l'eau distillée ont été effectués et l'agent développant a été ajouté pour réaliser la réaction d'oxydation. La lecture à 450 nm a été effectuée après 8 minutes avec le TECAN infinite M200Pro. La valeur d'albumine a été rapportée sur le volume total d'urine mesuré lors de la récolte de l'échantillon, permettant d'obtenir la quantité d'albumine en µg pour 24 heures.

### **2.1.3 Mesure de la pression artérielle moyenne**

La pression artérielle moyenne chez les souris a été mesurée de façon non invasive grâce au CODA High Throughput System de Kent Scientific. L'appareil utilise la technologie de VPR (*pression volumique*) afin d'obtenir des données précises et reproductibles, notamment la pression systolique moyenne, la pression diastolique moyenne ainsi que la pression moyenne, mesurable en additionnant la pression systolique moyenne avec le double de la pression diastolique moyenne et en divisant la somme totale par 3 (DeMers et Wachs, 2020). La souris est placée dans un tube pour la maintenir en place et deux manchons sont installés autour de sa queue : un manchon OCC (*occlusion*) et un manchon VPR. Le manchon OCC permet d'empêcher la circulation sanguine dans la queue de la souris lorsque celui-ci est gonflé. L'OCC va ensuite doucement se dégonfler et permettre au manchon VPR de mesurer les caractéristiques du flux sanguin de retour dans la queue. Lorsque le sang retourne à la queue, le manchon VPR mesure le gonflement de la queue résultant des pulsations artérielles du flux sanguin de la souris. La pression artérielle systolique est mesurée automatiquement à la première apparition de gonflement de la queue. Cette technique nous permet d'évaluer si la pression artérielle moyenne est influencée par les différents niveaux d'IGFBP2 dans nos groupes de souris.

### **2.1.4 Détermination du débit de filtration glomérulaire**

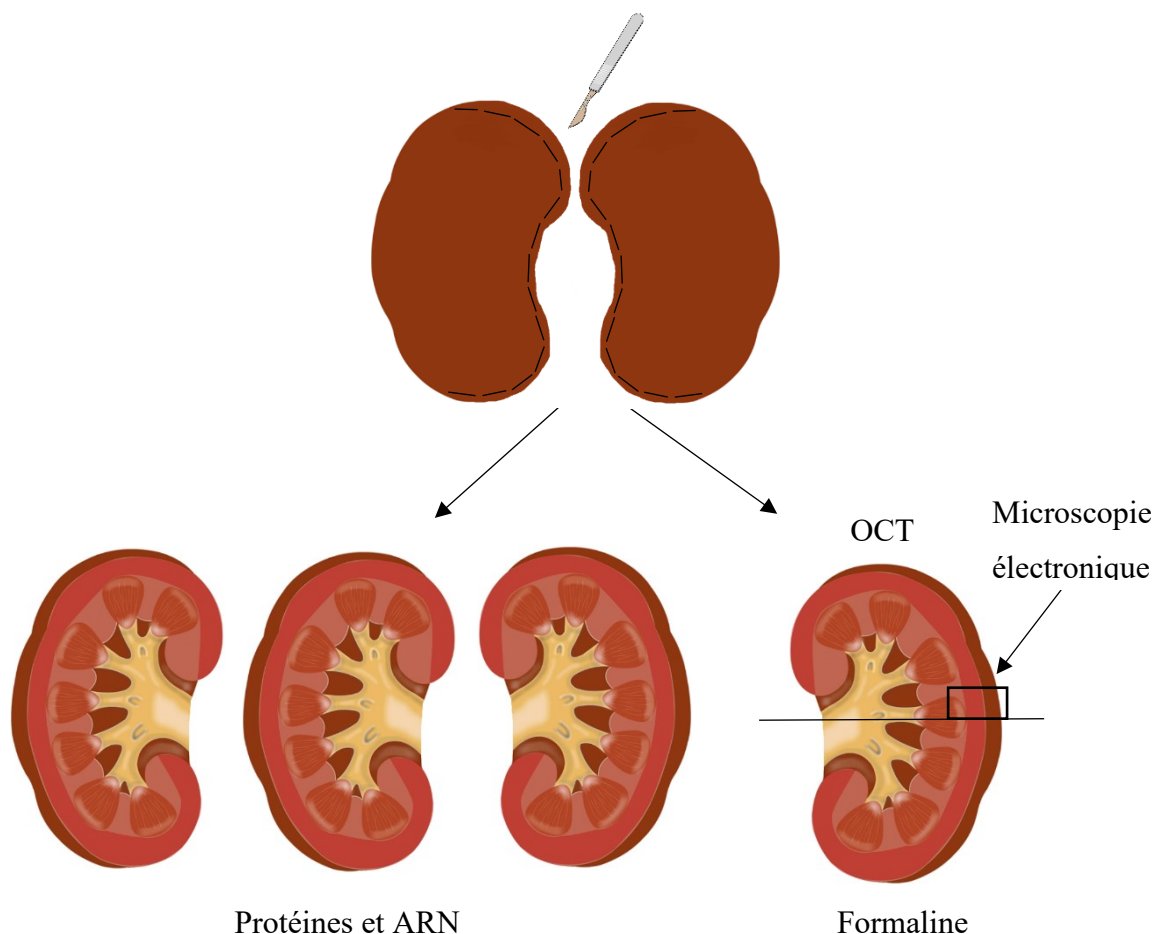
Un bon indicateur de la fonction rénale est le débit de filtration glomérulaire. Le protocole utilisé pour déterminer le *Glomerular filtration rate* (GFR) chez la souris est validé par l'*Animal Models of Diabetic Complications Consortium* (AMDCC). Le produit utilisé est le *fluorescein isothiocyanate* couplé à l'inuline (FITC-inuline, Sigma-Aldrich cat# F3272) qui est dilué dans de la saline 0,9% afin d'obtenir une concentration masse/volume de 5%. On mesure le volume de FITC-inuline à injecter à la souris de façon rétro-orbitale en multipliant la masse de la souris par 3,74. Puisque l'inuline n'est pas absorbée par l'organisme, il sera filtré par les reins de la souris. Le FITC est un fluorophore qui est lié à l'inuline et qui va permettre de quantifier le débit de filtration glomérulaire. On récolte un volume de sang de 20 µL par tubes capillaires (Fisher, Toronto, ON, Canada, cat#22-362-566) par le bout de la queue de la souris à plusieurs temps précis : 3, 7, 10, 15, 35, 55 et 75 minutes après l'injection rétro-orbitale. Les capillaires contenant le sang sont ensuite centrifugés et 2 µL de plasma sont récoltés pour être mélangés à 8 µL d'HEPES (500 mmol/L, pH=7,4). On utilise ensuite

2  $\mu$ L du mélange pour doser sur une plaque NanoQuant, ce qui va permettre de lire l'absorbance avec un faible volume. La lecture est faite à une longueur d'onde de 485nm. On trace une courbe de fluorescence en fonction du temps grâce aux données obtenues et on détermine la constante d'élimination du FITC-inuline. Avec le logiciel GraphPad Prism 8, on détermine le « K2 » pour chaque souris et on compare cette valeur entre les différents groupes de souris.

### ***2.1.5 Extraction des glomérules et des tubules rénaux***

À 7 mois d'âge, les souris ont été euthanasiées par exsanguination puis un rein et un demi-rein, coupé de façon transversale, ont été utilisés pour l'extraction des glomérules et des tubules. Le demi-rein restant a été utilisé pour l'histologie ainsi que la microscopie électronique (voir Figure 10). Pour l'extraction de glomérules et de tubules, 8 tubes Falcon de 50 mL ont été utilisés : 3 tubes stériles et 5 tubes non stériles. Deux tubes stériles et 2 non stériles ont été recouverts d'un filtre de 150  $\mu$ m, 1 tube de chaque a été recouvert d'un filtre de 70  $\mu$ m et les 2 tubes non stériles restants ont été recouverts d'un filtre 40  $\mu$ m. Avec les parties du rein restantes, le cortex rénal a été isolé et haché finement avec un scalpel jusqu'à obtenir une pâte. La pâte a été séparé en 2 afin d'isoler les protéines ainsi que l'ARN : 2/3 pour les protéines et 1/3 pour l'ARN. La pâte pour les protéines a été étendue sur un filtre préhumidifié de 150  $\mu$ m d'un tube non stérile et lavé avec environ 7 mL de PBS stérile tout en appliquant une légère pression sur le filtre afin de tout faire passer. Deux autres lavages ont été répétés et le filtrat a été passé sur le 2<sup>e</sup> filtre de 150  $\mu$ m non stérile puis rincé avec 10 mL de PBS stérile, sans appliquer de pression. Le filtrat a ensuite été passé au travers du filtre de 70  $\mu$ m non stérile et rincé avec quelques gouttes de PBS. Le filtre a ensuite été coupé avec le scalpel et mis dans un eppendorf identifié glomérules et contenant 300  $\mu$ L de tampon de lyse (Tableau 2). Le filtrat a finalement été transféré lentement sur le filtre de 40  $\mu$ m avant d'être rincé et coupé avec le scalpel et transféré dans un eppendorf identifié tubules contenant 300  $\mu$ L de tampon de lyse. Pour extraire l'ARN, le même protocole a été utilisé, mais avec des tubes stériles afin de conserver l'intégrité de l'ARN. Plutôt que d'ajouter les filtres dans des eppendorfs contenant du tampon de lyse, les filtres ont été placés dans des eppendorfs stériles dans lesquels 1 mL de Tri Reagent a été ajouté. Tout le protocole a été réalisé sur glace afin de diminuer les risques de dégradation des protéines et de l'ARN.





**Figure 10 : Utilisation des différentes parties des reins de souris**

Les 2 reins de la souris ont été récoltés lors de l'euthanasie. Ceux-ci ont été coupés de façon transversale afin d'obtenir 4 demi-reins, dont 3 ont été utilisés pour l'extraction des glomérules et des tubules. Le demi-rein restant a servi à l'histologie et la microscopie électronique (Modifié de anatomic.us, 2020).

#### **2.1.6 Mesure des niveaux d'IGFBP2 circulant**

Le sang des souris a été récolté lors de l'euthanasie afin d'isoler le plasma. Pour ce faire, le sang a été placé dans un tube séparateur et centrifugé à 4 °C durant 3 minutes à 13 000g, ce qui permet de récolter le plasma et de le transférer dans un autre tube. Afin de mesurer les niveaux d'IGFBP2 circulants, un test ELISA a été réalisé avec la trousse *IGFBP2 Mouse SimpleStep* de la compagnie *Abcam* (cat# ab207615). Cette trousse utilise un anticorps de capture qui est marqué avec une étiquette d'affinité ainsi qu'un anticorps de capture conjugué rapporteur qui va venir capter l'IGFBP2 dans l'échantillon. Tout ce complexe va être

immobilisé grâce à un anticorps contre l'étiquette d'affinité, qui se trouve au fond des puits. Pour réaliser cette technique, tout le matériel et les solutions ont été tempérés à température pièce. Les échantillons de plasma ont été dilués 1 : 1 000 dans du tampon de lavage PT 1X et une courbe standard a été préparée en suivant le protocole fourni par la trousse. Un volume de 50 µL de la courbe standard et de chaque échantillon à tester a été placé dans un puits de la plaque et 50 µL du mélange d'anticorps ont été ajoutés. La plaque a ensuite été scellée et incubée à TP durant 1h sous agitation à 400 RPM. Trois lavages de 350 µL avec du tampon RT 1X ont été effectués et 100 µL du substrat TMB a été ajouté à chaque puits avant que la plaque ne soit incubée dans le noir durant 10 minutes sous agitation à 400 RPM. La solution d'arrêt a finalement été ajoutée dans tous les puits et l'absorbance a été mesurée à 450 nm avec le TECAN infinite M200Pro. Pour obtenir les valeurs d'IGFBP2 circulant, l'absorbance du contrôle négatif a été soustrait à l'absorbance de tous les échantillons et la courbe standard a permis d'interpoler les valeurs obtenues pour chaque échantillon.

## **2.2 Immunohistochimie**

Après avoir euthanasié les souris, le demi-rein non utilisé pour l'extraction des glomérules et des tubules a été coupé en deux et une partie a été placée au fond d'un cube de plastique et recouvert de milieu *Optimal Cutting Temperature* (OCT) pour être conservé à -80°C. L'autre section du rein a été fixée 24 heures dans la formaline 3,7% et ensuite transférée dans de l'éthanol 70%. Les reins ont été envoyés à la plateforme d'histologie de l'Université de Sherbrooke pour effectuer des coupes de 4 µm et différentes colorations.

### **2.2.1 Colorations**

La plateforme d'histologie de l'Université de Sherbrooke a réalisé plusieurs colorations comme la coloration à l'acide périodique de Schiff (PAS) qui colore en mauve le collagène de type IV retrouvé dans le mésangium des glomérules. La coloration HE hématoxyline et éosine (HE) a aussi été réalisée pour colorer les noyaux cellulaires. Sur une autre série de lames, la coloration au Trichrome de Masson a été faite afin de marquer en bleu le collagène et ainsi observer la fibrose glomérulaire dans les souris.

### **2.2.2 Acquisition d'images et quantification**

Les images ont été prises en champ clair sur le microscope Nikon Eclipse Ti avec un objectif 40X sans huile d'immersion. Les images ont ensuite été modifiées dans le logiciel Photoshop pour convertir en noir les couleurs mauves représentant le mésangium. Le logiciel ImageJ a permis de faire une analyse binaire des images en quantifiant les pixels sélectionnés après la conversion des couleurs. Le protocole utilisé pour mesurer l'expansion du mésangium dans les glomérules rénaux est basé sur le protocole de l'AMDCC. Le même protocole est utilisé pour mesurer la fibrose et l'hypertrophie glomérulaire.

### **2.3 Microscopie électronique**

Au moment de l'euthanasie de la souris, une petite section du cortex rénal a été récoltée et placée dans un eppendorf contenant du liquide à microscopie (2,5% glutaraldéhyde, 0,1 M cacodylate) pour être fixée et ensuite conservée à 4°C. La plateforme d'histologie de l'Université de Sherbrooke a post-fixé les échantillons durant 90 minutes dans une solution de 0,1 M cacodylate 1% osmium tetroxide et les a ensuite déshydratés grâce à des concentrations d'éthanol croissantes. Pour la microscopie électronique à balayage (MEB), les morceaux ont été séchés au CO<sub>2</sub> avant d'être recouverts d'or-palladium. Les échantillons ont été observés avec un microscope à balayage électronique JEOL (modèle JSM-840). Pour la microscopie électronique à transmission (MET), les morceaux ont été infiltrés avec de la résine et polymérisés durant 48 heures à 60 °C. Avec un ultramicrotome (Leica Ultracut UCT), des coupes de 80 nm ont été faites et observées grâce au microscope électronique à transmission Hitachi H-7500. Une région contenant un minimum de 10 pédicelles bien visibles est utilisée pour quantifier l'effacement des fentes de filtration, pour un total d'environ 50 mesures et ainsi mesurer la moyenne pour chaque souris.

### **2.4 Podocytes murins**

Les podocytes utilisés proviennent d'une lignée cellulaire immortalisée extraite à partir de souris immortomouse. Ces souris possèdent l'antigène SV40 grand T, une protéine qui est dérivée du papillomavirus. Elle est capable de rendre les cellules prolifératives, mais seulement sous le contrôle d'un promoteur sensible à la température et à l'interféron gamma (IFN $\gamma$ ) (Jat *et al.*, 1991). Les podocytes de ces souris sont donc prolifératifs à 33 °C et se

différencient à 37 °C. Les expériences sont réalisées après une différenciation complète des podocytes, soit 2 semaines à 37 °C.

#### **2.4.1 Milieu de culture**

Le milieu de culture qui est largement utilisé pour les podocytes est le *Roswell Park Memorial Institute medium* (RPMI). Les cellules ont été cultivées dans des conditions normales de glucose et le RPMI-1640 sans glucose de Sigma-Aldrich (cat# R1383) a été utilisé pour préparer nos bouteilles de milieu de culture. Le contenu d'une bouteille de RPMI-1640 a été dissous dans 1 L d'eau nanopure pour produire 1 L de milieu de culture. Le pH de la solution est ensuite ajusté à 7.2. Nous avons ajouté 2 g/L de bicarbonate de sodium pour tamponner la solution ainsi que 1 g/L de d-glucose et 4,75 g/L d'HEPES. Le tout a été filtré avec un filtre 0,5 µm et conservé à 4 °C. La concentration finale du milieu RPMI est de 5,6 mmol/L de glucose. Pour les étapes de prolifération et différenciation cellulaire, le milieu a été complété avec 5% de FBS (*Fetal Bovine Serum*) inactivé à la chaleur (Wisent), 1% de P/S (*pénicilline/streptomycine*) de Wisent et 0,1% de gentamicine de Wisent. Les milieux de culture utilisés pour les traitements sur les podocytes contiennent également 1% de P/S, mais seulement 0,1 % de FBS. Le milieu normal glucose (NG) possède une concentration de 1 g/L de glucose alors que le milieu élevé en glucose (HG) a été augmenté à 4,5 g/L ou 25 mmol/L de glucose.

#### **2.4.2 Culture des podocytes**

Au début de la culture des podocytes, les cellules ont été conservées en phase proliférative dans une flasque non adhésive de 75 cm<sup>2</sup> dans un incubateur à 33 °C avec 5% de CO<sub>2</sub> dans un milieu RPMI 5% en présence d'IFN $\gamma$  10 U/mL (Figure 11). Le milieu de culture a été changé aux 2 jours afin d'assurer une bonne prolifération cellulaire. Lorsque les cellules ont été à environ 90-95% de confluence, elles ont subi un passage comme suit : le milieu de culture dans la flasque a été retiré pour être remplacé par 10 mL de PBS stérile préchauffé à 37 °C pendant 5 minutes. Le PBS a ensuite été retiré et 2 mL de Trypsine-EDTA 0,05% a été ajouté (Wisent, cat #325-542-CL) a été ajouté puis rapidement retiré. Par la suite, la flasque a été placée à 37 °C durant 30 secondes et les cellules ont été resuspendues dans 10 mL de RPMI. Un décompte cellulaire a été réalisé avec un hématimètre et une nouvelle

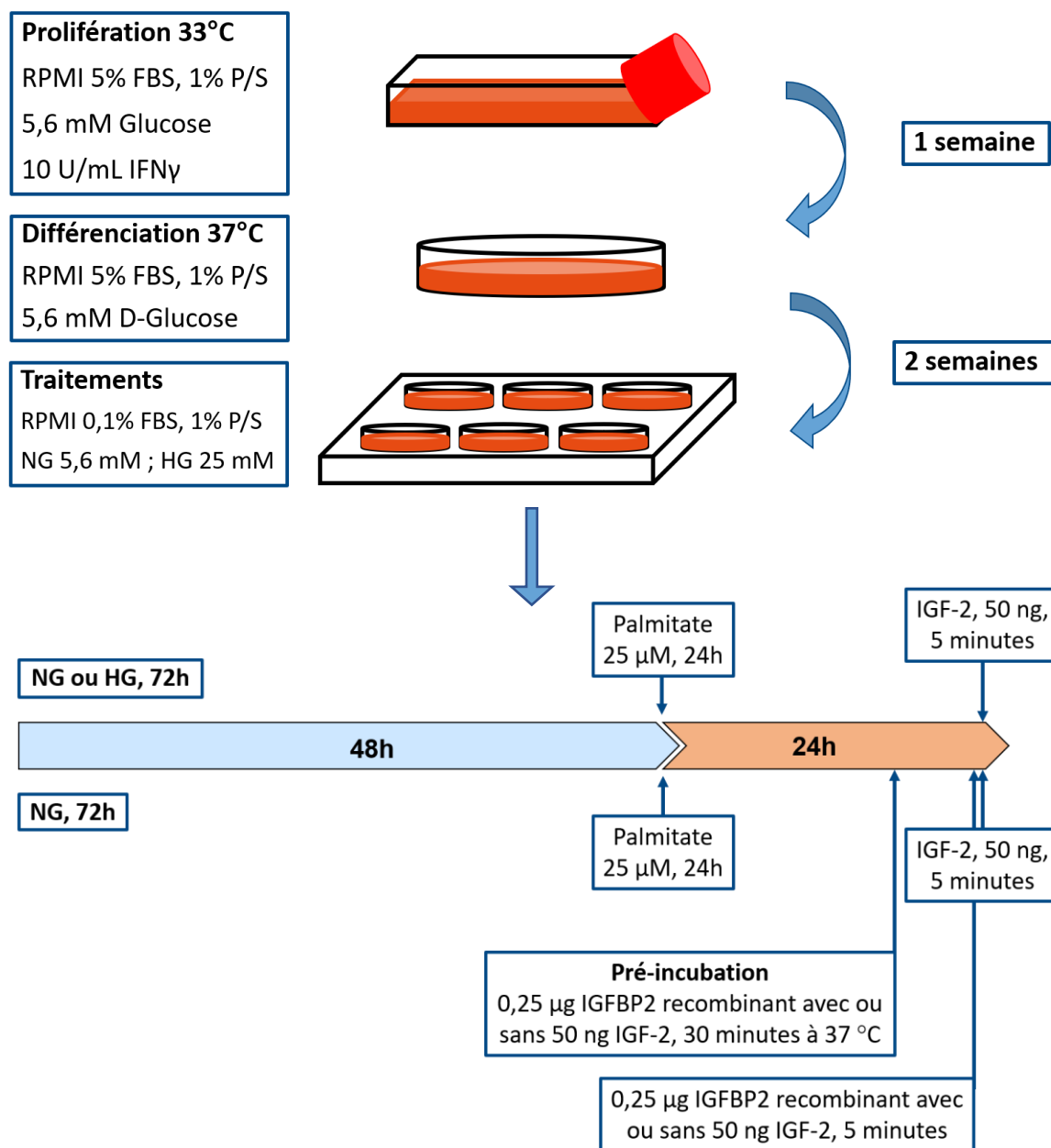
flasque avec  $5 \times 10^5$  cellules a été préparée. La confluence de 90-95% se fait en environ 1 semaine afin d'avoir un processus constant et d'obtenir les mêmes réponses cellulaires.

Au moment de réaliser un passage,  $1,5 \times 10^5$  cellules ont été mises dans un pétri à 37 °C jusqu'à obtenir une confluence élevée, après environ 1 semaine. Les podocytes adoptent un profil de différenciation à 37 °C. Un second passage a ensuite été effectué dans les mêmes conditions et les cellules ont été divisées dans d'autres pétris à une concentration de  $3 \times 10^5$  cellules/pétri. Il s'agit de la deuxième semaine de différenciation cellulaire pour les podocytes. Une fois la confluence atteinte à nouveau, les cellules ont été passées une dernière fois et ont été mises dans des plaques de 6 puits avec  $8 \times 10^4$  cellules/puits pour commencer les traitements.

#### ***2.4.3 Traitements des podocytes***

Après avoir fait un passage des podocytes dans les plaques de 6 puits, les cellules ont eu 48 heures pour bien adhérer les puits avant de commencer les traitements. La totalité du traitement est de 72 heures. Les podocytes ont été exposées à des concentrations NG ou HG pendant 72 heures, avec un changement de milieu après 2 jours. Certaines cellules ont été traitées avec du palmitate 25  $\mu$ M, un acide gras libre saturé qui va causer une lipotoxicité et ainsi mimer un diabète de type 2, durant les 24 dernières heures du traitement. Lors des 5 dernières minutes du traitement, tous les milieux de culture dans les puits ont été changés pour du milieu RPMI 0% FBS et une concentration de 50 ng/mL d'IGF-2 (Cedarlane cat# 792-MG-050) a été ajouté dans certains puits pour observer l'effet de l'hyperglycémie sur les voies de signalisation.

Un autre traitement avec les podocytes a été réalisé. Les cellules ont toutes été exposées en NG durant 72 heures, avec un changement de milieu après 2 jours. La moitié des puits ont été traités avec du palmitate 25  $\mu$ M durant les 24 dernières heures. À la fin du traitement, nous avons incubé 0,25  $\mu$ g/mL d'IGFBP2 recombinant (Cedarlane cat# 797-B2-025) avec ou sans 50 ng/mL d'IGF-2 dans du milieu RPMI 0% à 37 °C durant 30 minutes avant de stimuler les cellules durant 5 minutes. D'autres puits ont aussi été stimulés avec une concentration de 50 ng/mL d'IGF-2 durant 5 minutes, dans le but d'étudier l'impact d'un recombinant d'IGFBP2 et d'une stimulation à l'IGF-2 sur la signalisation cellulaire.



**Figure 11 : Protocole de culture et traitements des podocytes**

Les podocytes sont en prolifération à 33 °C dans un milieu 5% FBS et interféron  $\gamma$  durant 1 semaine. À 37 °C, la différenciation se fait durant 2 semaines et les traitements ont été effectués dans des plaques à 6 puits avec du milieu 0,1% FBS. Le milieu NG contient 5,6 mmol/L de glucose et le milieu HG contient 25 mmol/L de glucose. Le milieu de culture a été changé aux 2 jours. Du palmitate 25  $\mu$ M a été ajouté 24 h avant la fin du traitement et du IGF-2 seul, du IGFBP2 recombinant seul ou un mélange des 2 avec pré-incubation de 30 minutes est ajouté 5 minutes avant la fin du traitement selon l'étude.

#### 2.4.4 Extraction cellulaire

À la fin du traitement des podocytes, le milieu de culture a été retiré et du PBS froid a été ajouté dans les puits pour laver les cellules. Le PBS a ensuite été retiré pour être remplacé par un tampon de lyse de type RIPA (*Radio-Immunoprecipitation Assay*, Tableau 2). Dans les plaques de 6 puits, 150  $\mu\text{L}$  de tampon a été ajouté par puits avant d'être incubés sur glace pour une durée de 20 minutes. Les podocytes sont ensuite grattés et transférés dans un eppendorf de 1,5 mL afin d'être centrifugés durant 10 minutes à 13 000 RPM à 4 °C. Le surnageant a été récolté et mis dans un nouvel eppendorf avant d'être placé à -80 °C pour être conservé.

**Tableau 2 : Composition du tampon de lyse**

Ingrédients	Concentration initiale	Concentration finale	Volume pour 1 mL ( $\mu\text{L}$ )	Volume pour 1 tube (10mL)	Volume pour 30 tubes (mL)
dH <sub>2</sub> O	-	-	716	7,16	214,8
Tris-HCl; pH 7,4 (à partir du Tris base)	1 M	50 mmol/L	50	0,5	15
NaCl	5 M	150 mmol/L	30	0,3	9
EDTA; pH 7,4	0,5 M	2 mmol/L	4	0,04	1,2
Sodium désoxycholate	10%	0,5%	50	0,5	15
SDS	10%	0,1%	10	0,1	3
Triton	10%	1,0%	100	1	30
À ajouter une fois le tampon décongelé ( $\mu\text{L}$ )					
PMSF	0,1 M	1 mmol/L	10	100	
Aprotinin	5,1 mg prot./mL	0,0255 mg prot./mL	5	50	
Leupeptine	1 mg/mL	0,01 mg/mL	10	100	
À ajouter frais : faire un ratio selon le volume nécessaire					
NaF	200 mmol/L	1 mmol/L	5	50	
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	0,1 M	1 mmol/L	10	100	
Volume total	-	-	1 mL	10 mL	

## 2.5 Analyses protéiques

### 2.5.1 Immunobavardage

Les échantillons cellulaires ont été dosés en utilisant les réactifs *DC Protein Assay* de *BioRad* (cat# 500-0113,0114,0115) et un volume représentant une quantité égale (de 10 à 30 µg) de protéines a été ajouté à 10 µL de Laemmli 2X (Tableau 3). Les échantillons ont ensuite été chauffés durant 5 minutes dans un bloc chauffant à 90 °C et migrés dans un gel de polyacrylamide. Un gel de 10% d'acrylamide a été utilisé pour obtenir les résultats de ce projet, afin de bien séparer les protéines d'intérêts (Tableau 4). Un marqueur de poids moléculaire (*Precision Plus Protein Dual Color standard* de *BioRad*) a également été migré avec les échantillons afin de valider le poids moléculaire des protéines observées. Les gels ont été migrés dans un tampon de migration (25 mmol/L Tris-base, 1% SDS, 1,92 M glycine, ddH<sub>2</sub>O) à 110V durant 10 minutes pour faciliter l'entrée dans le gel. Les protéines ont ensuite migré à 200V pendant 1h pour bien séparer les protéines au travers du gel.

**Tableau 3 : Composition du tampon Laemmli**

Ingrédients	2X	4X	[Finale]
1 M Tris-HCl, pH 6,8	2,5 mL	5 mL	62,5 mmol/L
Glycérol	4 mL	8 mL	10%
10% (w/v) SDS	0,8 g	1,6 g	2%
2-βmercaptoéthanol	800 µL	1600 µL	~300 mmol/L
0,05% (w/v) bleu de bromphénol	40 mg	80 mg	0,1%
dH <sub>2</sub> O	2,5 mL	5 mL	
Complété à	20 mL	20 mL	



**Tableau 4 : Composition du gel d'acrylamide**

<b>Ingrédients</b>	<b>Gel concentrateur 4%</b>	<b>Gel séparateur 10%</b>
dH <sub>2</sub> O	5,8 mL	9,7 mL
Bis/Acrylamide (Biorad) 40%	1 mL	5 mL
1.5 M Tris-HCl, pH 8,8	-	1 mL
1,0 M Tris-HCl, pH 6,8	1 mL	-
SDS 10%	80 µL	200 µL
APS 10%	80 µL	100 µL
TEMED (VWR cat # 97064-684)	8 µL	10 µL

À la suite de la migration des protéines, le gel a été placé dans un tampon de transfert (25 mmol/L Tris-base, 1,92 M glycine, 20% méthanol, ddH<sub>2</sub>O) durant 5 à 10 minutes. Une membrane de PVDF (Fisher cat# IPVH00010) a été utilisée et préalablement humidifiée dans du méthanol puis dans le tampon de transfert. Le gel et la membrane ont ensuite été placés dans une cassette afin de permettre le transfert des protéines du gel vers la membrane. Avec les appareils BioRad, le transfert se fait à 100V pendant 30 minutes à 4 °C. Après le transfert, la membrane a été rincée avec de l'eau distillée et colorée avec une solution de Ponceau S. Il s'agit d'une solution rouge permettant de vérifier si les protéines ont bien été transférées sur la membrane lors du transfert. Elle permet également de voir si les protéines ont migré de façon égale tout le long du gel et il est possible de couper la membrane en plusieurs sections afin de regarder plus d'une protéine d'intérêt à la fois.

La membrane a ensuite été rincée avec de l'eau distillée avant d'être bloquée avec du lait 5% (5% lait dans du PBS-T) durant 1h à température pièce sous agitation afin de limiter les interactions qui sont non spécifiques entre la membrane et l'anticorps primaire. Une fois le blocage terminé, la membrane a été placée dans un tube Falcon de 50 mL contenant l'anticorps primaire (Tableau 5) à une concentration de 1 :1 000 dans une solution de lait 5% ou encore de BSA 5% (5% BSA dans du PBS-T). Le tube a été placé à 4 °C dans un rotateur de tubes pour toute la nuit. Par la suite, la membrane a été lavée au minimum 3 fois durant 5 minutes dans du PBS-T pour éliminer toute trace de l'anticorps primaire qui ne serait pas lié à la membrane. Un anticorps secondaire (Tableau 5) qui est couplé avec la HRP a été incubé avec la membrane durant 1h à TP dans du lait 5% sous agitation. Les concentrations de

l'anticorps secondaire variaient entre 1 :2 000 et 1 :10 000 et l'anticorps souris ou lapin était choisi en conséquence du type d'anticorps primaire utilisé plus tôt. Trois lavages de 5 minutes avec du PBS-T ont été répétés et la membrane a été incubée durant 1 minute avec une solution de révélation ECL (ThermoFisher Scientific cat# PI32106) ou Luminata Forte (Millipore cat# WBLUF0100) lorsque la protéine d'intérêt était moins fortement exprimée.

**Tableau 5 : Liste des anticorps utilisés**

<b>Anticorps</b>	<b>Fournisseur</b>	<b>Cat#</b>
p-Akt	<i>Cell signaling</i>	4058S
t-Akt	<i>Cell signaling</i>	9272S
p-ERK	<i>Cell signaling</i>	4370S
t-ERK	<i>Cell signaling</i>	9102S
p-IGF1R $\beta$	<i>Cell signaling</i>	3918S
IGF1R $\beta$	<i>Cell signaling</i>	3027S
IGFBP2	<i>Abcam</i>	Ab188200
Actine HRP	<i>Santa Cruz</i>	Sc-1616
Anti-mouse HRP	<i>Cell signaling</i>	7076S
Anti-rabbit HRP	<i>Cell signaling</i>	7074S

Après l'incubation, l'enzyme HRP qui se trouve sur la membrane a permis de produire un signal par chimiluminescence et a été détecté avec l'appareil ChemiDoc MP Imaging System de BioRad. Les images ont été obtenues avec le logiciel ImageLab de BioRad et la quantification des bandes a également été réalisée avec ce programme. Les valeurs densitométriques obtenues ont été rapportées sur les valeurs d'un gène stable, telles que l'actine ou encore la forme totale de la protéine d'intérêt. Les résultats ont été rapportés ensuite sur les contrôles, soit la condition LG pour les cellules, soit les souris NDM dans les expériences *in vivo* afin de permettre une comparaison entre les différentes conditions.

La même membrane a parfois été utilisée pour l'incubation de plus d'un anticorps primaire. Pour y arriver, une solution de détachement a été utilisée afin de défaire la liaison entre la membrane et l'anticorps primaire déjà présent sur la membrane. La solution de ThermoFisher Scientific (cat# PI46430) a été incubée avec la membrane durant 15 minutes

à TP sous agitation. Trois lavages de 10 minutes avec du PBS-T ont ensuite été réalisés et la membrane a été incubée dans du lait 5% afin de la bloquer à nouveau. À partir de ce moment, le protocole d'immunobuvardage décrit précédemment a été répété avec un nouvel anticorps primaire.

## **2.6 Analyses de l'expression génique**

### ***2.6.1 Extraction de l'ARNm***

Pour l'extraction de l'ARNm dans les podocytes, celle-ci a été réalisée en retirant le milieu de culture et en ajoutant 1 mL de Tri Reagent (BioShop Canada, Burlington, ON, Canada, cat# TR118-500) dans les puits des 6 puits, sans rinçage au PBS et à TP. Le liquide a été récolté et transféré dans des eppendorfs et incubé durant 5 minutes à TP pour assurer une bonne dissociation des protéines du noyau. Pour l'extraction de l'ARNm à partir des souris, 1 mL de Tri Reagent a été préalablement ajouté dans les eppendorfs à la fin de l'extraction des glomérules et des tubules. Le même protocole a ensuite été utilisé pour les cellules et les glomérules. Un volume de 200 µL de chloroforme a été ajouté dans les échantillons avant d'être agités 15 secondes et incubés à TP pendant 15 minutes. Les tubes ont été centrifugés à 12 000 g durant 15 minutes à 4 °C dans le but de séparer les composantes cellulaires en 3 phases. De ces 3 phases, la section aqueuse transparente qui se retrouve sur le dessus de l'eppendorf contient l'ARNm. Cette phase a été transférée dans un nouvel eppendorf avec 500 µL d'isopropanol et incubé à TP durant 10 minutes. Cette étape permet de faire précipiter l'ARNm. Les échantillons ont été centrifugés à 12 000 g durant 8 minutes afin de former un culot d'ARNm au fond du tube. Le surnageant a été retiré et le culot lavé avec 1 mL d'éthanol 75% RNase free froid. Une centrifugation de 5 minutes à 7 500 g a été réalisée et l'éthanol a été retiré avant d'ajouter 10 µL d'eau RNase free (Qiagen cat# 129112) dans les tubes pour dissoudre le culot. À partir de ce moment, l'ARN a été conservé à -80 °C.

### ***2.6.2 Transcription de l'ADNc***

L'ARN a été dosé grâce au NanoDrop 2000 (ThermoFischer Scientific) et le volume représentant 1 µg d'ARN a été mis dans un tube. Un µL d'oligo(dt) random primer (500 µg/mL, Invitrogen) et 1 µL d'un mélange contenant des nucléotides à 10 mmol/L (dNTP, Invitrogen) ont été ajoutés dans le tube et complétés à 12 µL avec de l'eau RNase free. Avec l'appareil C1000 Thermal Cycler de BioRad, les échantillons ont été chauffés pendant 5

minutes à 65 °C pour dénaturer l'ARN. Les tubes ont ensuite été mis sur glace 1 minute avant d'y ajouter un mélange de 4 µL de *5X First Strand Buffer* (Invitrogen), 2 µL de Dithiothréitol (DTT) 0,1 M (Invitrogen), 1 µL de RNase Out (Invitrogen) et 1 µL de Superscript IV RT (Invitrogen). Le protocole de transcription inverse a par la suite été réalisé avec le même appareil : 50 minutes à 37 °C et 15 minutes à 70 °C. Une fois le protocole terminé, chaque échantillon a été complété avec 80 µL d'eau pour diluer l'ADNc et les tubes sont conservés à -20 °C jusqu'à leur utilisation.

### 2.6.3 PCR quantitative (qPCR)

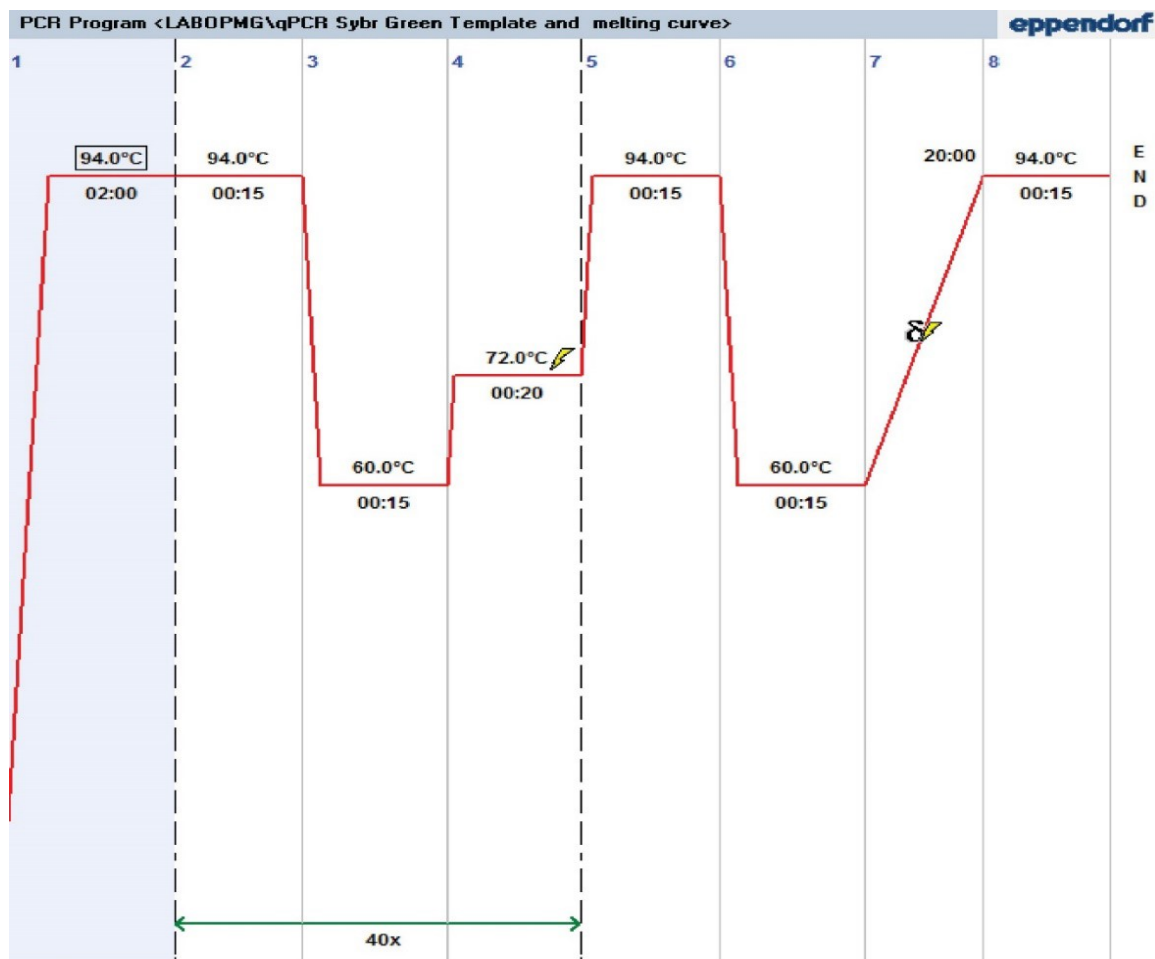
La réaction de qPCR est utile pour quantifier l'expression d'un gène dans nos échantillons en utilisant des amorces spécifiques. La technique de SYBR Green a été utilisée pour les expériences. Le produit SYBR Green est responsable de l'émission d'une fluorescence lorsqu'il est lié à de l'ADN double brin. Cette fluorescence va être proportionnelle à la quantité d'ARN d'intérêt présent dans l'échantillon. Avec une recette fournie sur le site de DNA Polymerase Technology (Tableau 6), le laboratoire a fabriqué sa propre recette de SYBR Green adapté pour nos expérimentations. Les échantillons testés ont été préparés en utilisant 1 ng/µL d'ADNc et 500 nM du SYBR Green 1X et de chaque amorce (Tableau 7). Chaque échantillon a ensuite été ajouté dans une plaque de 96 puits de Axygen en duplicata. L'appareil Realplex Mastercycler de Eppendorf a ensuite permis de réaliser le programme suivant : 40 cycles de 15 secondes à 94 °C, 15 secondes à 60 °C et 20 secondes à 72 °C, servant respectivement à la séparation des brins d'ADN, à l'hybridation des amorces et à l'élongation (voir Figure 12). Une liste complète des amorces utilisées pour le projet est répertoriée dans le tableau 8, telles que les différents isoformes d'IGFBP, mais aussi des facteurs d'atteinte rénale comme le collagène de type IV (ColIV), le *transforming growth factor beta* (TGF-β), la fibronectine 1 (FN1) et la *Kidney-Injury Molecule 1* (KIM-1).

**Tableau 6 : Préparation du MasterMix SYBR Green 2X**

<b>Ingrédients</b>	<b>Compagnie</b>	<b>Cat#</b>	<b>1500 réactions</b>
Klentaq Buffer 10X	DNA Polymerase Technology	rb10	3 mL
dNTPs (10 mmol/L)	Invitrogen	18427-088	600 µL
Omni KlenTaq	DNA Polymerase Technology	340	120 µL
Sybr Green 10X	Invitrogen	S-7563	3 mL
RNase/DNase free H <sub>2</sub> O	Wisent	809-115-CL	8,28 mL
<b>Total</b>	<b>-</b>		<b>15 mL</b>

**Tableau 7 : Protocole d'une réaction de qPCR**

<b>Ingrédients</b>	<b>1 tube de 50 µL</b>	<b>[Finale]</b>
2X MasterMix SYBR Green	25	1x
Gene F primer 100 µM	0,25	500 nM
Gene R primer 100 µM	0,25	500 nM
DEPC water	19,50	
RT product (10 ng/µL)	5	1 ng/µL
<b>Total</b>	<b>50 µL</b>	



**Figure 12 : Programme pour le qPCR**

Réprésentation graphique des différentes températures et des différents temps pour les cycles de la réaction de qPCR. La première étape dure 2 minutes à 94 °C, suivi d'un cycle de 15 secondes à 94 °C, 15 secondes à 60 °C et 20 secondes à 72 °C qui est répété 40 fois. La réaction se termine avec une séquence de 15 secondes à 94 °C, 15 secondes à 60 °C et 15 secondes à 94 °C.

**Tableau 8 : Séquences des amorces utilisées pour les expériences de qPCR**

Gène	Forward	Reverse
mIGFBP1	TGCCCCGAGTTCCTAACTG TTG	CGGCCACGCCAATCTG
mIGFBP2	CCTCAAGTCAGGCATGAA GGA	TGCCGGTGCTGTTCATTG
mIGFBP3	GGTCCCTGCCGCAGAGA	CAGCACATTGAGGAACTTCAGATG
mIGFBP5	CTCATGATTCCAAACGTG TGTTG	TGGGCTATGCACTTGATGCA
mIGF1R- $\beta$	ACCTCAATGCCAACAAGT TCGT	CATACCGAAATCTCCAATTTTGAC T
mCol IV	GGCGGTGCACAGTCAGAC CAT	GGAATAGCCAATCCACAGTGA
mTGF- $\beta$	GCAGTGGCTGAACCAAGG A	AGCAGTGAGCGCTGAATCG
mFN1	GTGTAGCACAACTTCCAA TTACGAA	GGAATTTCCGCCTCGAGTCT
mKIM-1	CCGTGGCTATCACCAGGT ACA	GAAGGCAACCACGCTTAGAGA
mGAPDH	GCATGGCCTTCCGTGTTC	GATGTCATCATACTTGGCAGGTTT

## 2.7 Analyses statistiques

Les résultats et les données seront tous présentés en moyenne  $\pm$  écart-type. Les analyses et les graphiques ont été faits avec le logiciel GraphPad Prism 8. En ce qui a trait aux analyses statistiques, ce sont des *one-way ANOVA*. Les résultats ont été considérés statistiquement significatifs si  $p < 0,05$ .

# RÉSULTATS

## 3.1 Suivi des souris

Les 6 différents groupes de souris (non diabétiques (*Ins2<sup>+/+</sup>*), diabétiques (*Ins2<sup>+/C96Y</sup>*), non-diabétiques surexprimant IGFBP2 (*Ins2<sup>+/+</sup> IGFBP2<sup>TG</sup>*), diabétiques surexprimant IGFBP2 (*Ins2<sup>+/C96Y</sup> IGFBP2<sup>TG</sup>*), non-diabétiques avec une délétion d'IGFBP2 (*Ins2<sup>+/+</sup> IGFBP2<sup>-/-</sup>*) et diabétiques avec une délétion d'IGFBP2 (*Ins2<sup>+/C96Y</sup> IGFBP2<sup>-/-</sup>*)) ont été suivis quant à leur poids et leur glycémie. À 7 mois d'âge, les souris diabétiques avaient un poids moyen de 21,6 g avec un écart-type de 4,3 g, alors que les souris non diabétiques avaient un poids moyen de 34,7 g avec un écart-type de 2,8 g (Tableau 9). De la même façon, les souris diabétiques transgéniques pour IGFBP2 avaient aussi un poids plus faible, à  $23,4 \pm 2,1$  g, comparativement aux souris non diabétiques transgéniques à  $36,5 \pm 3,9$  g. Les souris diabétiques avec la délétion d'IGFBP2 avaient un poids plus faible que les souris non diabétiques avec la délétion également, avec des poids de  $25,7 \pm 2,4$  g et  $33,9 \pm 2,4$  g respectivement. De façon intéressante, les souris diabétiques et les souris diabétiques avec la délétion d'IGFBP2 étaient significativement différentes, suggérant un impact bénéfique d'une délétion d'IGFBP2 sur la prise de poids des souris. Quant à la glycémie des différents groupes de souris, les souris diabétiques avaient une glycémie de  $517,8 \pm 85,2$  mg/dL alors que les souris non diabétiques avaient une glycémie de  $132,4 \pm 21,1$  mg/dL. Les souris diabétiques transgéniques avaient une glycémie de  $565,7 \pm 24,3$  mg/dL alors que les non diabétiques transgéniques étaient à  $145,7 \pm 22,0$  mg/dL. Pour les souris avec la délétion d'IGFBP2, les valeurs obtenues étaient de  $450,2 \pm 108,8$  mg/dL pour les diabétiques et  $133,7 \pm 31,5$  mg/dL pour les non diabétiques. Ces résultats démontrent qu'une délétion d'IGFBP2 semble aider à réduire la glycémie chez les souris diabétiques, malgré qu'elles soient encore considérées en hyperglycémie.

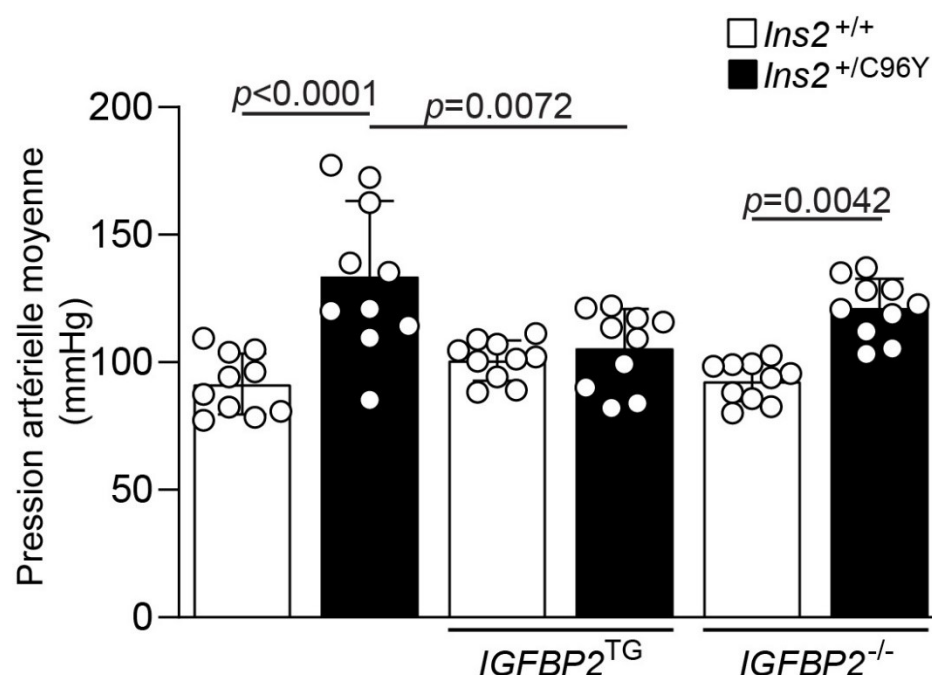
**Tableau 9 : Mesures des poids et des glycémies des souris à 7 mois d'âge**

	<i>Ins2<sup>+/+</sup></i>	<i>Ins2<sup>+/C96Y</sup></i>	<i>Ins2<sup>+/+</sup> IGFBP2<sup>TG</sup></i>	<i>Ins2<sup>+/C96Y</sup> IGFBP2<sup>TG</sup></i>	<i>Ins2<sup>+/+</sup> IGFBP2<sup>-/-</sup></i>	<i>Ins2<sup>+/C96Y</sup> IGFBP2<sup>-/-</sup></i>
Poids (g)	$34,7 \pm 2,8$	$21,6 \pm 4,3$	$36,5 \pm 3,9$	$23,4 \pm 2,1$	$33,9 \pm 2,4$	$25,7 \pm 2,4$
Glycémie (mg/dL)	$132,4 \pm 21,1$	$517,8 \pm 85,2$	$145,7 \pm 22,0$	$565,7 \pm 24,3$	$133,7 \pm 31,5$	$450,2 \pm 108,8$
N =	13	9	24	13	21	12



### 3.2 Pression artérielle moyenne des souris

Il est connu que l'hypertension chronique est un des deux principaux facteurs de risque du développement de la néphropathie diabétique, l'autre étant une hyperglycémie prolongée (Yan-Ming *et al.*, 2013). La pression artérielle moyenne a été mesurée avec la machine CODA chez les différents groupes de souris et les résultats sont présentés dans la Figure 13. On observe une augmentation significative de la pression artérielle moyenne chez les souris diabétiques comparées aux souris NDM, avec des pressions artérielles moyennes de 134 et 98 mmHg respectivement. On peut voir également que les mesures chez les souris DM avec la délétion pour IGFBP2 sont significativement plus élevées que celles des souris NDM avec la délétion, avec une pression artérielle moyenne de 117 mmHg. Finalement, les souris diabétiques avec la surexpression d'IGFBP2 ont une pression artérielle moyenne significativement plus basse que les souris diabétiques, la moyenne étant aux alentours de 108 mmHg. Ces résultats suggèrent qu'une surexpression de la protéine IGFBP2 aurait un impact bénéfique sur la pression artérielle moyenne des souris diabétiques.

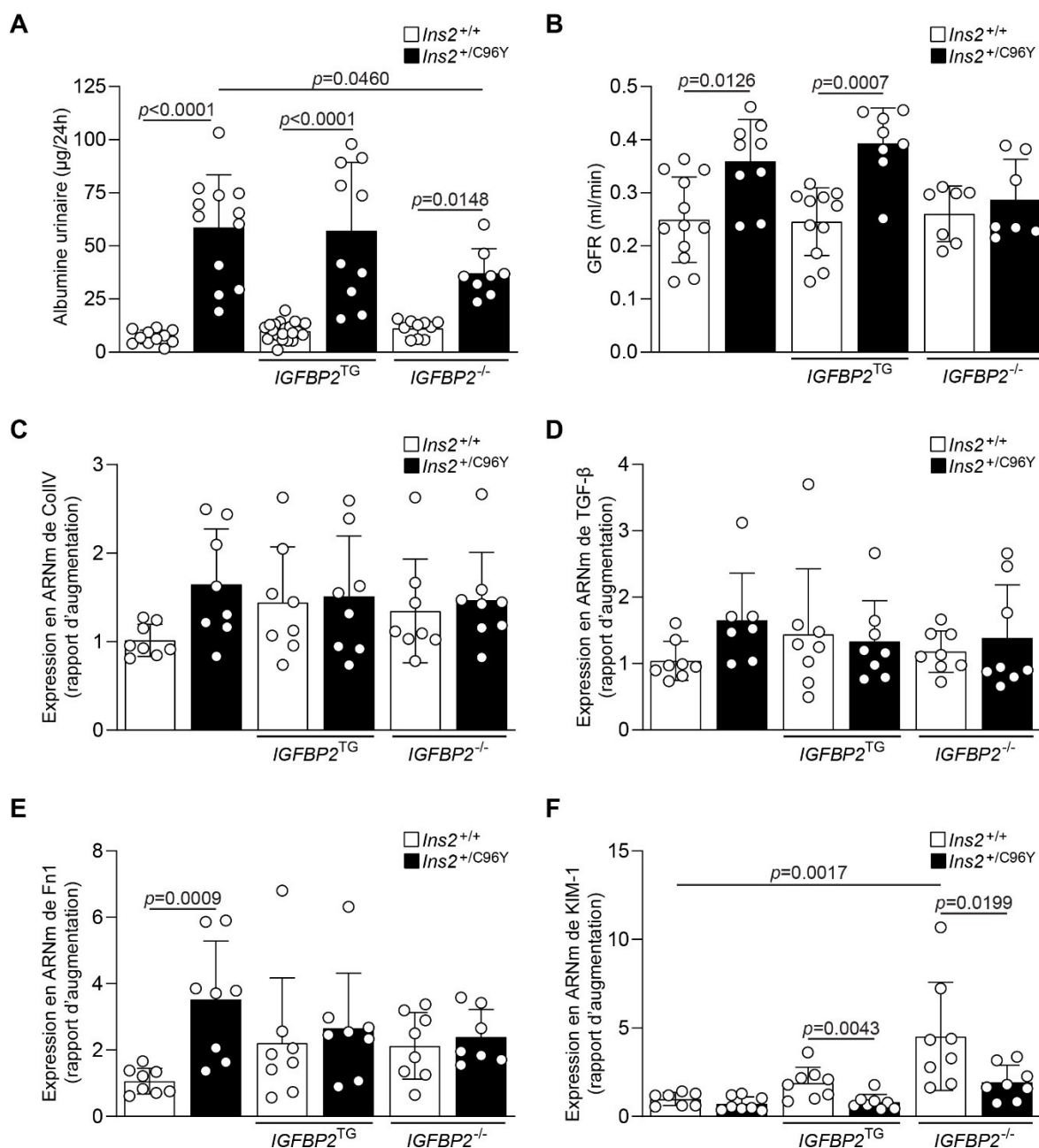


**Figure 13 : Pression artérielle moyenne des différents groupes de souris à 7 mois d'âge**

La pression artérielle moyenne a été mesurée dans les 6 groupes de souris à l'âge de 7 mois de façon non invasive avec la machine CODA. N=10 pour les différents groupes de souris.

### 3.3 Fonction rénale et marqueurs de la néphropathie diabétique

La fonction rénale possède différents marqueurs pouvant être évalués afin de constater l'apparition et suivre la progression de la néphropathie diabétique. Parmi ces marqueurs, l'albuminurie est le premier signe clinique à apparaître et elle a été mesurée chez les 6 groupes de souris par ELISA. Dans la figure 14A, on observe que les niveaux d'albumine urinaire sont significativement plus élevés dans les trois groupes de souris diabétiques comparés à leurs semblables non-diabétiques. Le groupe de souris diabétiques avec la délétion pour IGFBP2 a des valeurs également significativement moins élevées que pour le groupe de souris diabétiques, mais est tout de même considéré pathologique avec une moyenne de 36,83 µg/24h d'albumine urinaire. Un second marqueur efficace pour évaluer la fonction rénale est le débit de filtration glomérulaire (Figure 14B). Le GFR est significativement augmenté chez les souris diabétiques ainsi que chez les souris diabétiques avec la surexpression pour IGFBP2. Une légère augmentation est observée chez les souris diabétiques avec la délétion d'IGFBP2 comparée aux souris NDM avec la délétion, suggérant un débit de filtration glomérulaire normal chez les souris DM avec la délétion et donc un effet bénéfique d'une délétion d'IGFBP2 sur la fonction rénale. Quelques autres marqueurs de la fonction rénale pouvant nous aider à évaluer la présence de pathologies glomérulaires ont été mesurés par la technique de la PCR quantitative. Aucune différence significative n'a été observée en ce qui a trait à l'expression en ARNm du Col IV (Figure 14C) et du TGF- $\beta$  (Figure 14D), mais on peut voir tout de même une légère augmentation chez les différents groupes de souris comparativement aux souris non diabétiques. L'expression en ARNm de la fibronectine 1 (Figure 14E) est quant à elle significativement augmentée chez les souris diabétiques, soit d'environ 3 fois comparativement aux souris NDM. L'expression en ARNm de KIM-1 (*Kidney Injury Molecule-1*) est significativement plus forte dans les souris NDM avec le transgène d'IGFBP2 ainsi que chez les NDM avec la délétion d'IGFBP2, comparativement à leurs semblables diabétiques (Figure 14F). Aussi, l'expression chez les souris NDM avec la délétion est significativement plus élevée que chez les souris NDM de type sauvage.

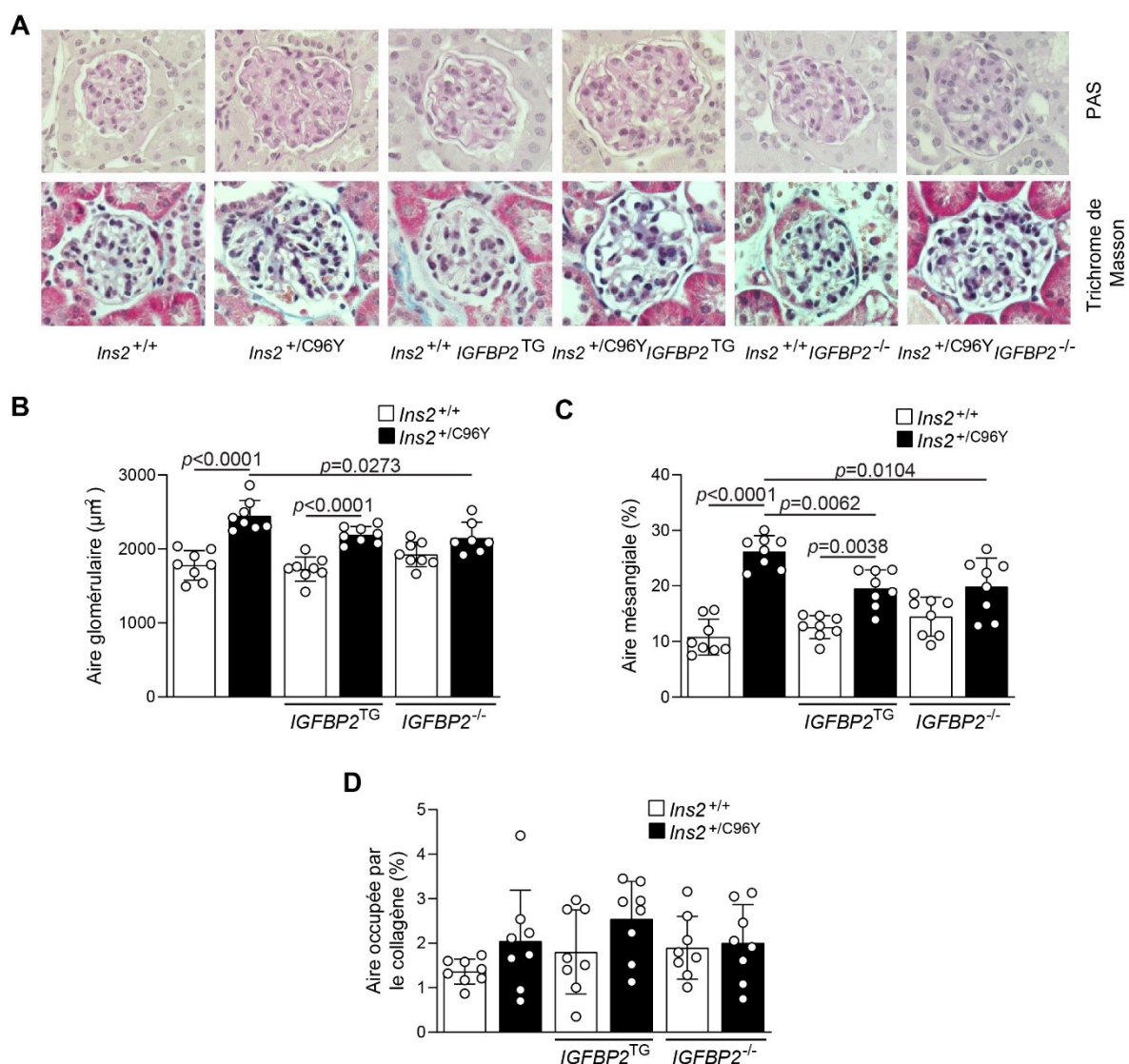


**Figure 14 : Impacts d'une surexpression ou d'une délétion d'IGFBP2 sur la fonction rénale et les marqueurs du développement de la néphropathie diabétique**

**A)** Les niveaux d'albumine urinaire rapportés sur le volume d'urine durant 24h à 7 mois d'âge dans les 6 groupes de souris. **B)** Débit de filtration glomérulaire à 7 mois d'âge dans les différents groupes de souris. Les différents niveaux d'expression en ARNm pour le collagène de type IV (**C**), le TGF-β (**D**), la fibronectine 1 (**E**) et KIM-1 (**F**) ont été évalués dans les glomérules des souris. N= 7-8 souris par groupe pour l'expression en ARNm des différents gènes.

### 3.4 Pathologie glomérulaire

Plusieurs marqueurs de la néphropathie diabétique ont été étudiés pour mon projet, comme l'hypertrophie glomérulaire. Dans la figure 15A, on observe des coupes transversales d'un glomérule rénal de souris. En partant de la gauche, il est possible de voir une coupe provenant d'une souris NDM, DM, IGFBP2 TG NDM, IGFBP2 TG DM, IGFBP2 KO NDM et IGFBP2 KO DM. Nous avons remarqué que les souris DM possèdent des glomérules plus gros comparés aux souris NDM, avec des aires glomérulaires de 2449,38 et 1778,45  $\mu\text{m}^2$  respectivement. La surexpression de la protéine IGFBP2 n'a pas été en mesure d'empêcher l'hypertrophie glomérulaire de façon significative chez les souris diabétiques, comme nous pouvons le voir par la quantification à la figure 15B. De façon intéressante, on remarque que le groupe de souris diabétiques avec la délétion d'IGFBP2 possède une hypertrophie glomérulaire significativement plus faible que le groupe de souris diabétiques de type sauvage, avec une aire glomérulaire de 2148,73  $\mu\text{m}^2$ . La coloration PAS permet également de colorer la matrice extracellulaire, ce qui nous permet ensuite de quantifier l'expansion du mésangium au sein du glomérule. Il s'agit d'un autre bon marqueur de la pathologie rénale, où plus l'intérieur du glomérule a une pigmentation mauve foncé, plus la matrice extracellulaire s'est propagée et il y a donc plus de mésangium. Dans la figure 15C, on observe que les souris diabétiques ont une expansion du mésangium significativement plus élevée que dans les souris NDM (26,2% contre 10,8% de mésangium), ainsi que dans les souris diabétiques transgéniques (19,54%) et celles avec la délétion d'IGFBP2 (19,85%). Une coloration au trichrome de Masson a également été effectuée pour observer le développement de fibrose glomérulaire dans les différents groupes de souris. Cette coloration consiste à colorer en bleu le collagène, qui augmente de façon anormale en cas de pathologie. Dans la figure 15D, on observe une légère augmentation entre les souris NDM et DM, 1,36% et 2,04% respectivement, mais aucune différence significative n'a été observée entre les différents groupes de souris.

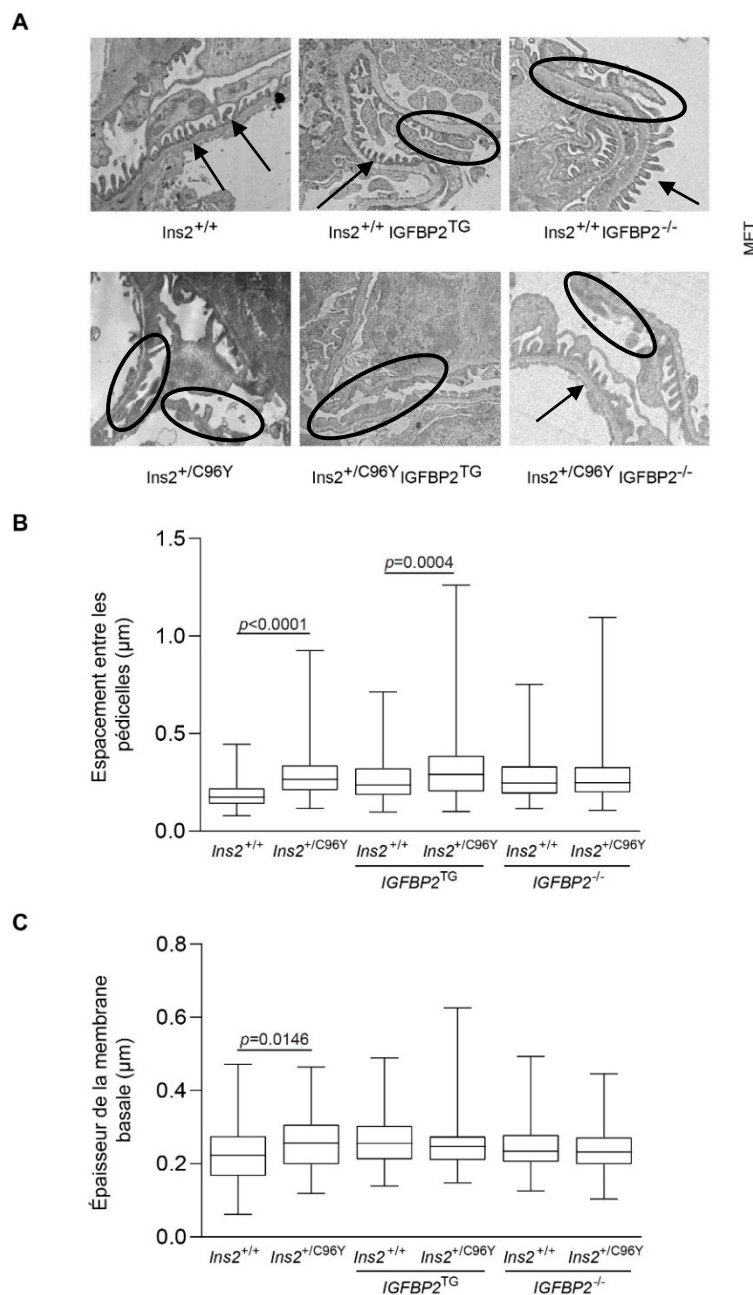


**Figure 15 : Impact de la protéine IGFBP2 sur le développement de la pathologie glomérulaire**

**A)** Images d'immunohistochimie de glomérules rénaux, colorés PAS pour la quantification de l'hypertrophie (en B), PAS pour le mésangium (en C) et coloration Trichrome de Masson pour voir l'expression de collagène et de fibrose. **B)** Quantification de l'hypertrophie du glomérule. **C)** Quantification de l'expansion du mésangium en % de surface occupée. **D)** Quantification du collagène en % de surface occupée. Quantification pour N=7-8 pour les différents groupes de souris

### 3.5 Effacement des pédicelles

Un événement précurseur du développement de la néphropathie diabétique est l'apoptose des podocytes. Cette mort cellulaire entraîne des répercussions néfastes sur les fentes de filtration et la morphologie générale des podocytes. La technique de microscopie à transmission permet de visualiser l'intégrité des pédicelles et des fentes de filtration. Sur la figure 16, on observe des coupes de cortex rénal provenant des différents groupes de souris. À gauche, dans la figure 16A, on remarque que les souris NMD ont des pédicelles bien allongés et espacés pour former des fentes de filtration efficaces, signe d'une bonne intégrité au niveau des podocytes. Pour ce qui est des souris diabétiques, on peut voir un effacement des fentes de filtration où il est difficile d'observer les pédicelles et l'espace entre ceux-ci. L'espacement entre les pédicelles est significativement plus élevé dans ces souris que dans les souris NDM, comme le démontre le graphique en 16B. Ce phénomène est également présent dans les souris avec une surexpression de la protéine IGFBP2. En effet, les souris non-diabétiques avec le transgène ont un espacement qui est plus élevé que les souris NDM et les souris diabétiques avec le transgène ont un espacement entre les pédicelles significativement plus élevé que les NDM transgéniques. Les souris possédant une délétion de la protéine IGFBP2 présentent un espacement entre les pédicelles plus élevés que les souris NDM, mais aucune différence significative n'est présente entre les NDM et DM avec la délétion d'IGFBP2. Dans la figure 16C, l'épaississement de la membrane basale glomérulaire a été mesuré. Il s'agit d'un autre précurseur du développement de la néphropathie diabétique qui affecte l'efficacité de la filtration rénale. Une différence significative a été observée entre les souris NDM et les souris DM, où ces dernières ont une membrane basale plus épaisse. Les autres groupes de souris ne présentent pas de différences significatives entre elles, mais démontrent tout de même un léger épaississement de la membrane basale, surtout chez les souris avec une surexpression d'IGFBP2.

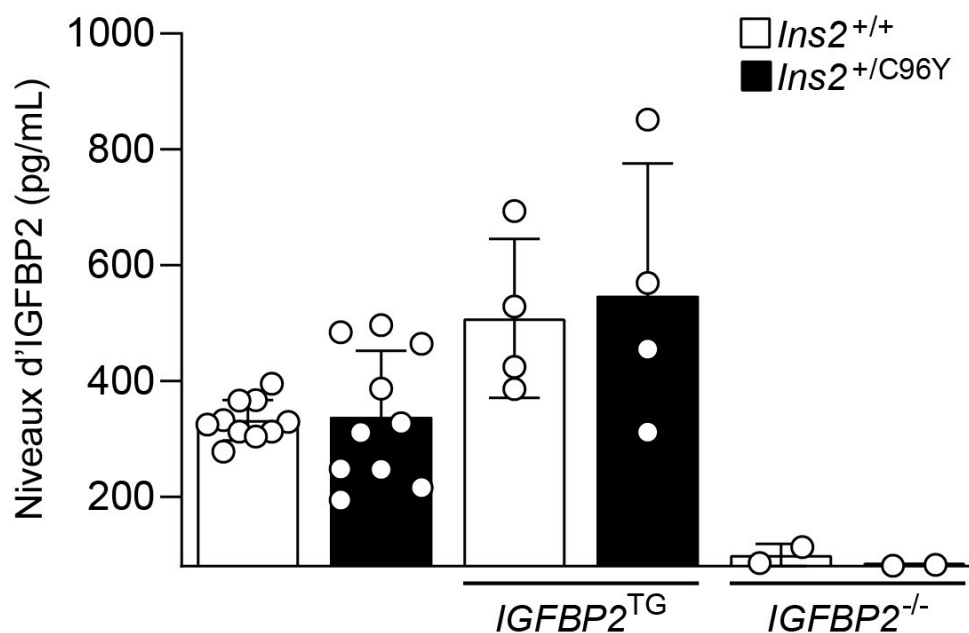


**Figure 16 : Impacts d'une surexpression ou d'une délétion d'IGFBP2 sur l'effacement des fentes de filtration des podocytes chez les souris**

**A)** Images de microscopie électronique à transmission du cortex rénal de souris afin d'observer les fentes de filtration au niveau du glomérule. Les flèches montrent des zones où les pédicelles sont bien espacés et bien entrelacés, alors que les cercles montrent des zones d'effacement des fentes de filtration. **B)** Mesure de l'espacement entre les pédicelles des différents groupes de souris. **C)** Mesure de l'épaississement de la membrane basale glomérulaire entre les différents groupes de souris. N=4 souris par groupe pour les différentes mesures.

### 3.6 Niveaux circulants d'IGFBP2 dans les souris

Les niveaux sanguins d'IGFBP2 ont été mesurés dans les différents groupes de souris grâce à un test ELISA. Les résultats obtenus à la figure 17 montrent que les niveaux circulants de la protéine sont semblables entre les souris non-diabétiques et diabétiques, avec des niveaux plasmatiques aux alentours de 300 pg/mL. Quelques souris avec la surexpression et la délétion d'IGFBP2 ont également été testées, afin de confirmer les niveaux plus élevés dans les transgéniques et presque nuls dans les souris avec la délétion.



**Figure 17 : Niveaux circulants d'IGFBP2 dans les différents groupes de souris**

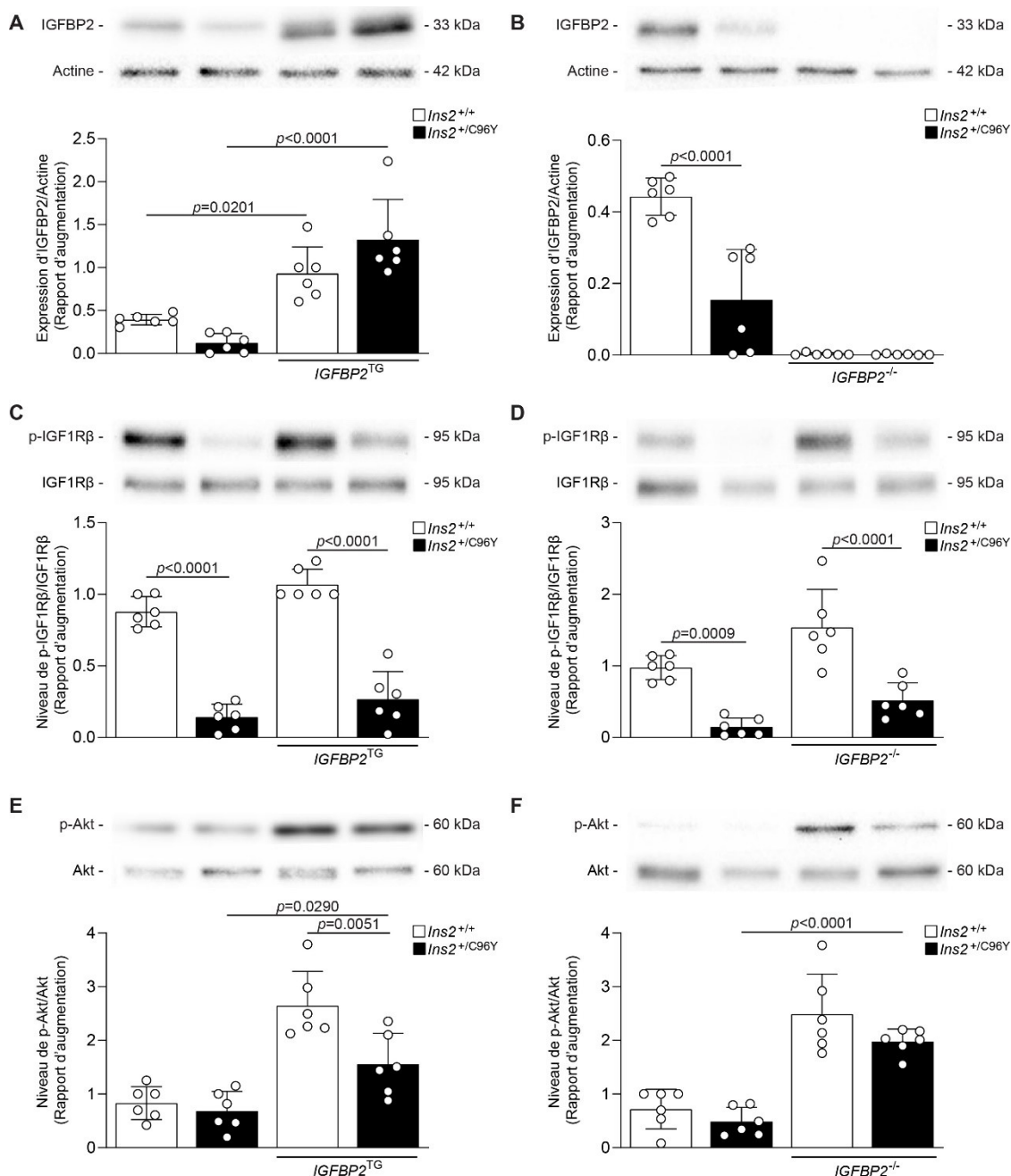
Les niveaux sanguins d'IGFBP2 ont été mesurés avec un test ELISA avec la trousse *IGFBP2 Mouse SimpleStep* de la compagnie *Abcam* (cat# ab207615). N=10 pour les NDM et DM, N=4 pour les TG et N=2 pour les KO.

### 3.7 Inhibition des voies de signalisation de l'IGF/IGFBP dans les glomérules rénaux

La signalisation de l'IGF a été évaluée dans le glomérule des souris afin d'observer l'impact du diabète et d'une surexpression ou d'une délétion d'IGFBP2 sur la voie de l'IGF. La figure 18 montre les différents niveaux d'expression protéique d'IGFBP2 et de l'activation d'IGF1R $\beta$  ainsi que d'Akt dans les 6 groupes de souris à l'étude. Les souris diabétiques semblent avoir une expression protéique plus faible d'IGFBP2 que les souris NDM (Figures 18A et 18B). On observe également une augmentation des niveaux d'IGFBP2 dans les souris



transgéniques NDM et DM comparativement aux souris NDM et DM de type sauvage et ce, de façon significative (Figure 18A). Les souris diabétiques possèdent une expression protéique plus faible d'IGFBP2 que les souris NDM (Figure 18B), alors que les souris avec la délétion d'IGFBP2 n'expriment aucunement la protéine, ce qui est normal pour ces souris. En ce qui concerne la phosphorylation du récepteur IGF1R $\beta$ , les souris NDM ont une activation protéique significativement plus élevée que les souris diabétiques et les souris NDM transgéniques ont également une expression significativement plus élevée comparativement aux souris DM transgéniques (Figure 18C). Pour ce qui est des souris avec la délétion d'IGFBP2, l'activation du récepteur est également significativement plus élevée dans les souris NDM que dans les souris diabétiques (Figure 18D), suggérant un rôle important du diabète sur la phosphorylation d'IGF1R $\beta$ . Si on observe l'activation protéique d'Akt en utilisant un anticorps permettant d'observer la phosphorylation de la sérine 473, on observe qu'il n'y a pas de différences entre les souris non-diabétiques et diabétiques (Figure 18E). En revanche, les souris non-diabétiques surexprimant la protéine IGFBP2 possèdent une augmentation de la phosphorylation d'Akt significativement plus grande que les souris diabétiques qui surexpriment IGFBP2. On observe aussi une activation plus grande chez les souris diabétiques transgéniques comparées aux souris diabétiques. Dans la figure 18F, on peut voir que les souris diabétiques avec la délétion d'IGFBP2 activent plus la protéine Akt que les souris DM de type sauvage de façon significative. Cette phosphorylation de la sérine 473 est importante dans l'activation d'Akt, puisqu'elle permet la pleine activation des voies subséquentes qui permettent de réduire l'apoptose des podocytes (Wang *et al.* 2015).

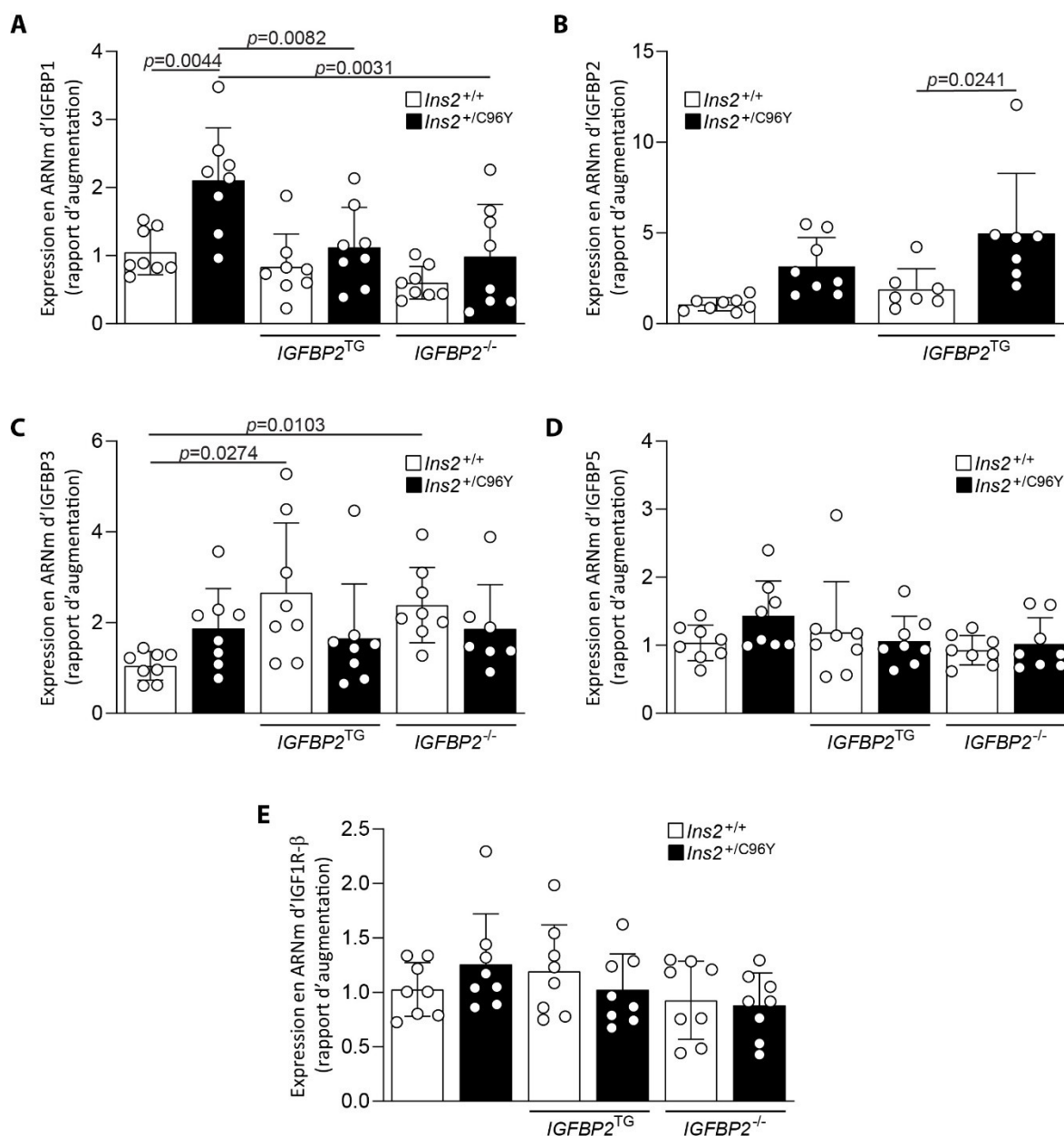


**Figure 18 : Niveaux d'expression protéique de différentes protéines dans les glomérules de souris**

Niveaux d'expression protéique d'IGFBP2 dans le glomérule de souris transgéniques (en A) et avec la délétion d'IGFBP2 (en B), du récepteur phosphorylé IGF1Rβ des souris transgéniques (en C) et avec la délétion (en D) et de p-Akt dans les souris transgéniques (en E) et avec la délétion (en F). Les graphiques représentent la moyenne des quantifications de différentes expériences d'immunobuvardage pour les 3 protéines. N=6 pour chaque groupe de souris.

### 3.8 Expression en ARNm des différentes IGFBPs et du récepteur IGF1R $\beta$ *in vivo*

Les niveaux d'expression de différentes isoformes d'IGFBPs ont été mesurés par qPCR. Dans la figure 19A, on observe que l'expression de l'ARNm de la protéine IGFBP1 varie entre les groupes de souris. Les souris diabétiques montrent une augmentation significative de l'expression d'IGFBP1 d'environ 2 fois comparativement aux souris non-diabétiques. Les souris DM ont également significativement 2 fois plus d'ARNm d'IGFBP1 que les souris DM avec la surexpression ou la délétion d'IGFBP2. Pour ce qui est de l'expression en ARNm d'IGFBP2, on observe une augmentation significative de 2,5 fois chez les souris diabétiques surexprimant la protéine, en comparaison aux souris NDM avec la surexpression (Figure 19B). Dans la figure 19C, les souris NDM démontrent des niveaux d'expression d'IGFBP3 2,5 fois plus faibles que chez les souris non diabétiques avec la surexpression ou la délétion d'IGFBP2. Pour l'isoforme IGFBP5 (Figure 19D), les 6 groupes de souris possèdent des niveaux d'expression en ARNm semblables. Aucune différence entre les souris n'a également été observée pour l'expression du récepteur IGF1R $\beta$  (Figure 19E).

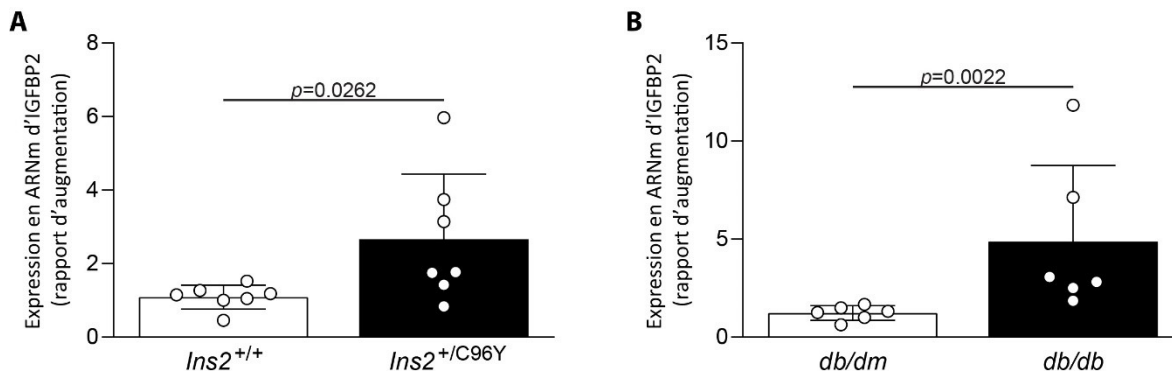


**Figure 19 : Niveaux d'expression en ARNm de différentes IGFBPs et d'IGF1R dans les glomérules de souris**

Niveaux d'expression d'ARNm à la suite d'un RT-PCR pour IGFBP1 (A), IGFBP2 (B), IGFBP3 (C), IGFBP5 (D) et IGF1R $\beta$  (E) dans les glomérules de souris non-diabétiques, diabétiques, non-diabétiques avec une surexpression ou une délétion d'IGFBP2 et diabétiques avec une surexpression ou une délétion. N=7-8 pour les différents groupes de souris.

### 3.9 Expression en ARNm d'IGFBP2 dans le cortex rénal de souris diabétiques de type 1 et 2

Le cortex rénal a été extrait chez des souris diabétiques de type 1 ainsi que dans un modèle de souris diabétiques de type 2, le modèle db/db, en plus de souris non-diabétiques contrôles pour les deux types de diabète. Les niveaux d'expression d'IGFBP2 ont été mesurés par qPCR. La figure 20A montre que l'expression de l'ARNm d'IGFBP2 est augmentée de 2,5 fois dans le cortex rénal des souris diabétiques de type 1 comparativement aux souris NDM. De plus, les souris diabétiques de type 2 ont une expression d'IGFBP2 4 fois plus élevée que dans les souris non-diabétiques db/dm (Figure 20B), suggérant que l'hyperglycémie causerait une augmentation de l'expression en ARNm d'IGFBP2.



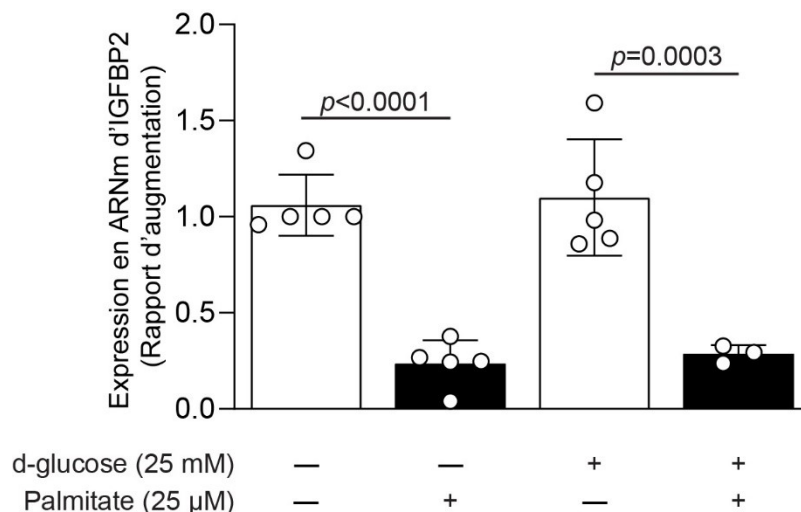
**Figure 20 : Niveaux d'expression en ARNm d'IGFBP2 dans le cortex rénal de souris diabétiques de type 1 et de type 2**

Niveaux d'expression en ARNm de la protéine IGFBP2 à la suite d'un RT-PCR dans le cortex rénal de souris. **A)** L'expression d'IGFBP2 a été mesurée dans un modèle de souris non-diabétiques *Ins2*<sup>+/+</sup> et diabétiques de type Akita. **B)** L'expression d'IGFBP2 a été mesurée dans un modèle de souris non-diabétiques *db/dm* et diabétiques *db/db*. N=6-7 pour les différents groupes de souris.

### 3.10 Expression en ARNm d'IGFBP2 dans les podocytes *in vitro*

Les niveaux d'expression en ARNm d'IGFBP2 ont été évalués spécifiquement dans une lignée de podocytes murins. Dans la figure 21, on observe que les podocytes murins exposés à des concentrations normales de glucose et de 25  $\mu$ M de palmitate durant 24h ont une expression d'IGFBP2 significativement plus faible que dans les podocytes murins en absence de palmitate. Les podocytes murins exposés à des concentrations de glucose de 25

mmol/L expriment des niveaux d'IGFBP2 semblables aux podocytes traités avec 5,6 mmol/L de glucose. Un traitement de 24h au palmitate réduit les niveaux d'expression d'IGFBP2 dans les cellules en hyperglycémie également, comparée aux cellules hyperglycémiques sans palmitate, suggérant ainsi un rôle du palmitate sur l'expression d'IGFBP2 dans les podocytes.



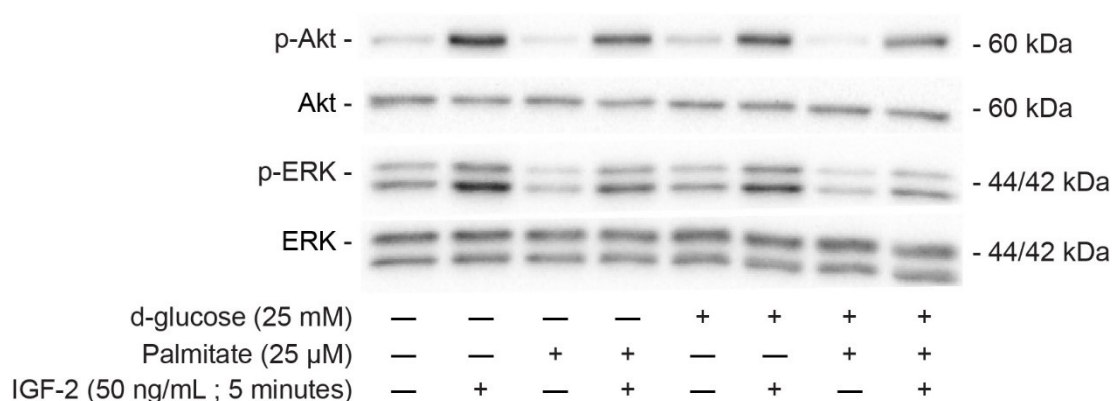
**Figure 21 : Expression d'IGFBP2 dans les podocytes murins en culture**

Les niveaux d'expression en ARNm de la protéine IGFBP2 dans des podocytes murins immortalisés en culture traités avec différentes concentrations de glucose et en présence ou non de palmitate à 25 μM. N=3-5 pour les différentes conditions de traitement.

### 3.11 Inhibition des voies de signalisation de l'IGF-2 dans les podocytes murins *in vitro*

L'effet de l'hyperglycémie sur les voies de signalisation de l'IGF a été étudié dans les podocytes en culture, puisque l'hyperglycémie est une des causes principales du développement de la néphropathie diabétique. Une stimulation à l'IGF-2 de 50 ng/mL dans les podocytes exposés à des concentrations normales de glucose a augmenté la phosphorylation d'Akt et ERK, indiquant que les podocytes répondent à une stimulation à l'IGF-2 (Figure 22). En présence de palmitate, on observe une absence de l'activation des voies de signalisation, pareillement aux conditions basales des cellules. En présence d'IGF-2 et de palmitate, les voies d'Akt et ERK sont faiblement stimulées. Dans les cellules traitées en hyperglycémie durant 72h, une stimulation à l'IGF-2 dans les podocytes a eu des effets moins importants sur la phosphorylation d'Akt et ERK. Le palmitate a encore une fois bloqué l'activation des voies de signalisation, alors qu'une combinaison d'IGF-2 et de palmitate

semble faiblement augmenter la phosphorylation d'Akt et ERK en hyperglycémie. Ces résultats ne sont pas significatifs et nécessitent d'autres tests afin de les valider.

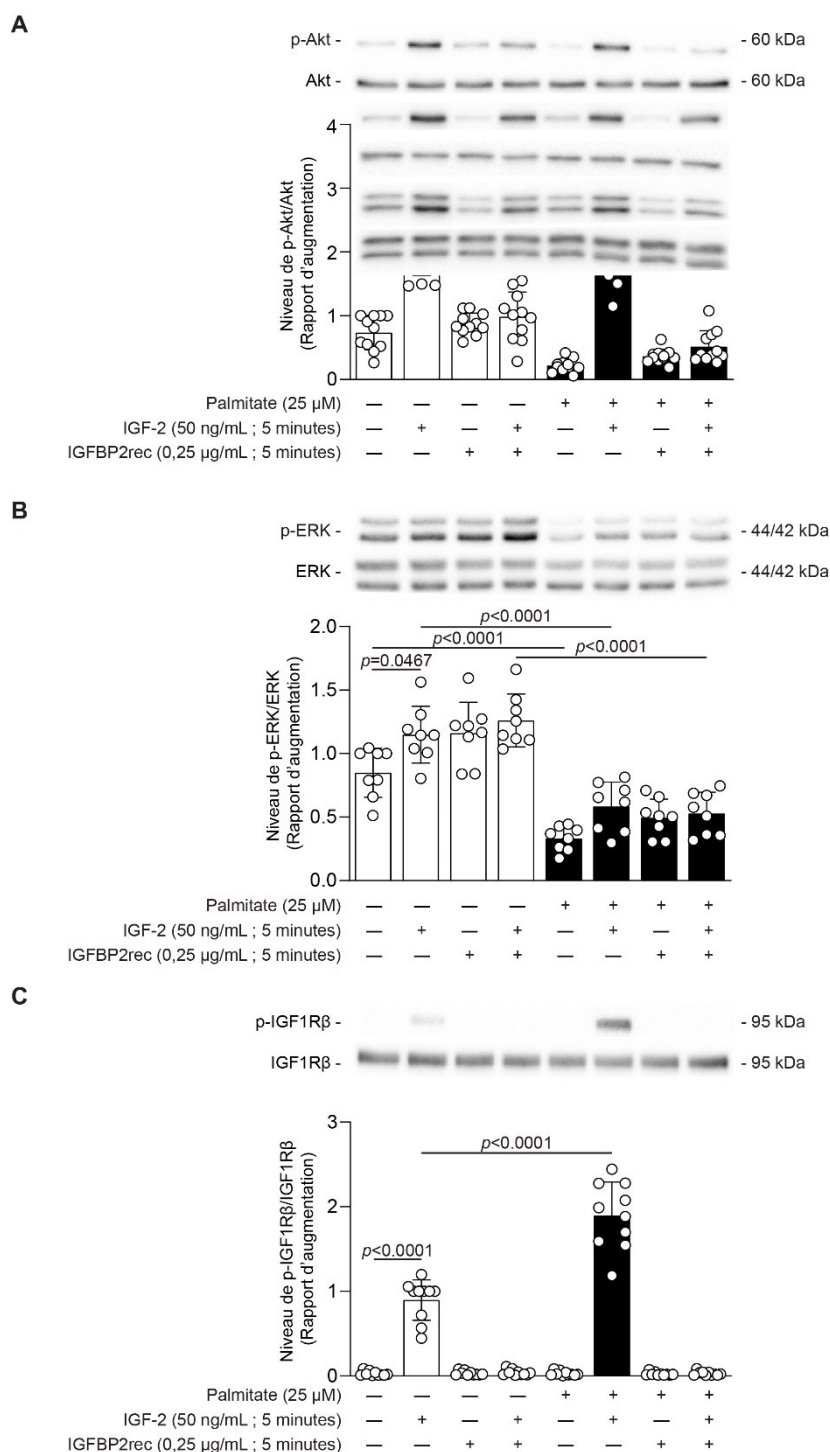


**Figure 22 : Inhibition des voies de signalisation d'IGF-2 dans les podocytes en culture**

Effets d'une stimulation à l'IGF-2 (50 ng/mL durant 5 minutes) sur le niveau de phosphorylation de Akt et ERK dans des podocytes exposés à différents traitements de glucose (5,6 ou 25 mmol/L) avec ou sans palmitate (25 μM).

### 3.12 Effets de la protéine IGFBP2 sur la signalisation de l'IGF-2 dans les podocytes *in vitro*

Les podocytes ont été traités avec un IGFBP2 recombinant afin d'étudier les voies de signalisation de l'IGF. Dans la figure 23, on observe qu'une stimulation à l'IGF vient encore activer la phosphorylation d'Akt (figure 23A), alors que l'IGFBP2 seul ne semble pas activer la voie. L'incubation d'IGFBP-2 avec IGF-2 empêche ce dernier à stimuler la phosphorylation d'Akt dans les podocytes. Les mêmes résultats ont été obtenus dans des cellules qui ont également subi un traitement de 24h au palmitate, mais à des niveaux plus faibles, puisque le palmitate réduit le niveau basal de la phosphorylation d'Akt de façon significative. Dans la figure 23B, la voie d'ERK a été étudiée. La stimulation à l'IGF-2 a augmenté la phosphorylation d'ERK dans les podocytes de façon significative. La phosphorylation est aussi augmentée dans les podocytes stimulés à l'IGFBP2 et avec les deux protéines. En revanche, dans les podocytes traités au palmitate, aucune différence n'est observée entre les 4 conditions, que ce soit avec une stimulation à l'IGF-2, l'IGFBP2 ou les deux. Le palmitate réduit également le niveau basal d'activation de la protéine ERK dans les différentes conditions. En ce qui concerne l'activation du récepteur IGF1Rβ, la stimulation



**Figure 23 : Effets du palmitate et du IGFBP2 dans les podocytes *in vitro***

Effets d'un traitement au palmitate, d'une stimulation à l'IGF-2 et/ou d'une stimulation à l'IGFBP2 sur l'activation de Akt (en A), de ERK (en B) et d'IGF1Rβ (en C). Les graphiques représentent la quantification de la phosphorylation de la protéine sur la forme totale de la protéine. N=8-11 pour les différentes protéines étudiées.



à l'IGF-2 phosphoryle significativement celui-ci (Figure 23C). En présence de palmitate, la stimulation à l'IGF-2 augmente significativement la phosphorylation du récepteur, comparé aux cellules sans palmitate avec une stimulation à l'IGF-2. En présence d'IGFBP2, le récepteur n'est tout simplement pas activé.

## DISCUSSION

L'apoptose des podocytes est un marqueur précoce du développement de la néphropathie diabétique. Il existe de nombreux mécanismes pouvant causer ce phénomène, notamment la perte de la signalisation intracellulaire de facteurs pro-survie dans les podocytes. Un grand nombre d'études ont déjà démontré l'importance de l'insuline dans ces cellules, mais d'autres facteurs peuvent venir influencer la survie cellulaire. Il a été démontré que les IGFs et les IGFBPs sont produits par les podocytes et interagissent de façon autocrine ou paracrine dans le rein. Les IGFs peuvent activer la voie PI3K/Akt pour promouvoir la survie cellulaire ainsi que la voie Ras-Raf-MEK-ERK1/2, importante à la prolifération. Un défaut dans la signalisation de ces protéines entraîne une atteinte podocytaire importante favorisant le développement de la néphropathie diabétique. L'isoforme IGFBP2 est la forme d'IGFBP produite en plus grande quantité dans le rein. Chez des adolescents obèses diabétiques, les niveaux circulants de la protéine sont réduits significativement comparativement à des adolescents obèses non-diabétiques et cette diminution corrèle avec une augmentation de l'albuminurie et de plusieurs marqueurs inflammatoires. Jusqu'à présent, peu d'informations étaient disponibles sur le rôle des IGFs et de la protéine IGFBP2 dans la dysfonction podocytaire et le développement de la néphropathie diabétique.

Dans cette étude, des modèles *in vivo* et *in vitro* ont été utilisés afin de déterminer l'impact de la protéine IGFBP2 sur la dysfonction podocytaire et le développement de la néphropathie diabétique. Le premier objectif de ce mémoire était d'étudier le rôle de la protéine IGFBP2 dans le développement de la néphropathie diabétique dans un modèle murin de diabète de type 1 qui surexprime IGFBP2 ou est déficient pour IGFBP2. Le deuxième objectif était de caractériser l'expression d'IGFBP2 dans la voie de signalisation de l'IGF dans des podocytes exposés à des concentrations élevées de glucose et/ou en présence d'acides gras saturés comme le palmitate.

### **Impacts d'IGFBP2 sur le glomérule et la dysfonction podocytaire**

Dans ce projet, des souris de type Akita ont été utilisées pour mimer le diabète de type 1. Il s'agit d'un modèle grandement utilisé pour l'étude de la néphropathie diabétique (Gurley *et al.*, 2006). Des souris Akita croisées et présentant une surexpression ou une délétion de la protéine IGFBP2 ont été étudiées pour comprendre le rôle d'IGFBP2 dans un diabète de type 1. Le poids et la glycémie à jeun des souris ont été mesurés à 7 mois d'âge pour les 6 différents groupes de souris. Une augmentation du poids a été constatée chez les souris DM transgéniques par rapport aux souris DM. La glycémie de ces deux groupes reste toutefois semblable avec des valeurs élevées et considérées hyperglycémiques. Les souris DM avec la délétion d'IGFBP2 démontrent une augmentation du poids et une diminution significative de la glycémie. Ces résultats restent toutefois loin des valeurs normales des souris NDM. Le tableau 8 présente ces résultats et montre que la surexpression de la protéine IGFBP2 ne permet pas d'augmenter significativement le poids des souris ou de diminuer l'hyperglycémie. La délétion d'IGFBP2 chez les souris diabétiques permet une augmentation plus importante du poids se rapprochant des NDM et une diminution significative de la glycémie, mais reste tout de même à des niveaux considérés hyperglycémiques. Ces résultats laissent croire qu'une délétion d'IGFBP2 serait bénéfique pour réduire la glycémie et contrôler et la prise de poids des souris souffrant de diabète de type 1.

L'hypertension artérielle chronique est l'un des facteurs de risque les plus importants du développement de la néphropathie diabétique et peut mener à la perte des podocytes. Il est déjà connu que les souris diabétiques Akita ont une pression artérielle moyenne plus élevée que les NDM (Zhao *et al.*, 2018). Nos résultats (Figure 13) corroborent avec ce qui a déjà été démontré dans la littérature, puisque nos souris DM présentent une pression artérielle moyenne significativement plus élevée que nos souris NDM. En ce qui concerne les souris DM transgéniques, nos résultats montrent une diminution significative de la pression artérielle moyenne en comparaison avec les souris DM, alors que les souris DM avec une délétion d'IGFBP2 montrent une très faible réduction de la pression artérielle moyenne. Une étude réalisée en 2007 par l'équipe de Wheatcroft *et al.* a démontré une diminution significative de la pression artérielle systolique chez des souris transgéniques pour IGFBP2 âgées de 10 mois comparativement aux souris contrôles. Cette diminution a également été observée chez des souris transgéniques nourries avec une diète régulière ou une diète riche

en gras durant 32 semaines, suggérant ainsi un rôle bénéfique d'une surexpression d'IGFBP2 sur la pression artérielle même dans un modèle de souris obèses. Cet effet serait potentiellement causé en partie par une production favorable de petits adipocytes, réduisant ainsi les niveaux de leptine dans les souris transgéniques et augmentant les niveaux d'adiponectines afin d'améliorer la pression artérielle par rapport aux souris contrôles (Wheatcroft *et al.*, 2007).

Plusieurs marqueurs de la pathologie rénale ont déjà été étudiés chez la souris diabétique Akita et montrent de nombreuses caractéristiques de la néphropathie diabétique (Denhez *et al.*, 2019). Dans la figure 15, on observe que nos résultats vont dans le même sens que les études précédentes, puisque les souris diabétiques démontrent une hypertrophie du glomérule ainsi qu'une expansion du mésangium en comparaison aux souris NDM. De plus, aucune différence importante n'a été observée avec la coloration au Trichrome de Masson dans ces 2 groupes de souris, signe qu'aucune fibrose glomérulaire ne semble s'être développée dans ces modèles. Notre étude est allée plus loin en étudiant ces marqueurs dans d'autres groupes de souris. Alors que les souris diabétiques transgéniques montrent une aire mésangiale significativement plus petite que les souris DM, les souris diabétiques avec la délétion d'IGFBP2 semblent avoir une aire mésangiale ainsi qu'une aire glomérulaire plus petite. Ces résultats semblent aller dans le même sens que les résultats d'une des rares études réalisées sur IGFBP2 dans le rein (Hise *et al.*, 1995). Dans cette étude, des rats avec une insuffisance rénale ont été utilisés et les auteurs ont remarqué que ces rats exprimaient jusqu'à 6 fois plus l'ARNm d'IGFBP2 dans le rein comparativement aux rats contrôles, associant ainsi une surexpression d'IGFBP2 avec une pathologie rénale. Quant aux souris diabétiques avec la délétion d'IGFBP2, une explication possible serait que les autres IGFBPs pourraient compenser le manque d'IGFBP2, dû à la grande ressemblance entre les IGFBPs et leurs différents niveaux d'expression dans le rein. Ce phénomène a déjà été étudié dans la souris, où une triple délétion d'IGFBP3, 4 et 5 causait très peu de changements physiologiques chez la souris hormis une faible diminution des niveaux circulants d'IGFs et une augmentation du nombre de cellules bêta dans le pancréas, puisque les autres IGFBPs pouvaient réguler les voies de signalisation de l'IGF efficacement. (Ning *et al.*, 2006). Nos résultats montrent que la surexpression et la délétion de la protéine IGFBP2 semblent être tous les deux bénéfiques pour ralentir l'expansion du mésangium chez les souris diabétiques.

D'autres marqueurs pathologiques sont représentés dans la figure 14, où on observe une augmentation de l'albuminurie et du débit de filtration glomérulaire chez les souris diabétiques en comparaison aux souris non-diabétiques, corroborant ainsi les autres marqueurs pathologiques expliqués plus haut. Ces facteurs ont déjà été étudiés par le passé et vont dans le même sens que la littérature (Denhez *et al.*, 2019). Les résultats obtenus montrent également une augmentation de ces deux marqueurs chez les souris DM transgéniques. Chez les souris DM avec la délétion d'IGFBP2, on assiste à une légère augmentation de l'albuminurie qui est plus faible que chez les souris DM. Notre étude a permis de montrer que la surexpression d'IGFBP2 en contexte de diabète ne permet pas d'empêcher ou de réduire l'atteinte rénale. Au contraire, les souris diabétiques sans IGFBP2 semblent posséder une meilleure intégrité rénale puisqu'elles semblent avoir un débit de filtration glomérulaire normal, mais des valeurs d'albumine urinaire encore considérées pathologiques.

Nos résultats montrent également une persistance dans l'augmentation de facteurs de pathologie glomérulaire en PCR quantitatif, soit pour le ColIV, le TGF- $\beta$  ainsi que la Fn1 chez les souris DM (Figure 14). L'augmentation de ces trois facteurs corrèle avec l'apparition et le développement de la néphropathie diabétique, comme il a été démontré dans une étude chez le rat (Malik *et al.*, 2019) et dans plusieurs études chez l'humain pour TGF- $\beta$  et Fn1 (Yamamoto *et al.*, 1993, Kotajima *et al.*, 1999). Bien que nos résultats ne montrent pas de différence significative entre les souris NDM et DM pour ColIV ( $p=0,0899$ ) et TGF- $\beta$  ( $p=0,1899$ ), on observe tout de même des augmentations importantes chez les souris DM qui pourraient être confirmées en rajoutant des souris à l'étude. La protéine KIM-1, connue pour être exprimée par les tubules proximaux, démontre une augmentation significative dans les souris NDM avec une délétion d'IGFBP2 (Satirapoj. 2018). En temps normal, les niveaux d'expression de KIM-1 sont presque indétectables et la protéine sert de biomarqueur pour détecter les dommages dans les tubules proximaux. Au niveau du glomérule, l'équipe de Zhao et collaborateurs a démontré que les niveaux de KIM-1 augmentaient avec le temps dans les glomérules de rats avec diabète de type 2 (Zhao *et al.* 2011). Cette augmentation était associée avec une perte des podocytes importante. Des expériences futures seront nécessaires afin de mieux comprendre l'impact d'une

surexpression ou délétion d'IGFBP2 sur l'expression glomérulaire de KIM-1 dans un modèle de diabète de type 1.

Puisque la dédifférenciation et l'apoptose des podocytes sont considérées comme des événements précoces de la néphropathie diabétique (Powell *et al.*, 2013), nous avons observé l'impact d'une surexpression ou d'une délétion d'IGFBP2 sur ces événements. La microscopie électronique à transmission présentée à la figure 16 montre un effacement des pédicelles potentiellement causé par l'hyperglycémie dans tous les groupes de souris, sauf pour les souris NMD où la glycémie est normale et où les pédicelles sont bien conservés. On observe également un épaissement de la membrane basale glomérulaire chez les différents groupes de souris, sauf les NDM, pareillement à l'augmentation du collagène de type IV, le principal composant de cette membrane. Ces modifications morphologiques seraient à l'origine de la baisse de la fonctionnalité de la barrière de filtration, menant ultimement à la néphropathie diabétique. Nos résultats laissent croire qu'un contrôle des niveaux d'IGFBP2 ne permet pas d'empêcher le développement de l'effacement des pédicelles dans les souris, ces dernières ayant une atteinte rénale trop avancée en excès ou en absence d'IGFBP2.

Les résultats obtenus par notre collaborateur de l'Université du Manitoba montrent que chez des adolescents obèses diabétiques, les niveaux sanguins d'IGFBP2 sont diminués de façon significative. Ces résultats vont dans le même sens qu'une étude réalisée chez des femmes sur une période de 9 ans, où des niveaux élevés d'IGFBP2 étaient inversement associés avec le risque de développer le diabète de type 2 (Rajpathak *et al.*, 2012). Alors que nos résultats ne démontrent pas de différence dans les niveaux circulants d'IGFBP2 entre les souris NDM et DM, une étude réalisée sur 3 662 patients montre que les niveaux circulants d'IGFBP2 sont augmentés en cas de diabète de type 1. Cette augmentation est encore plus importante chez les patients avec une complication du diabète de type 1 également (Sharma *et al.*, 2016). Au contraire, une étude a démontré que les faibles niveaux d'IGFs et d'IGFBPs circulants chez des enfants atteints du syndrome néphrotique étaient causés par une augmentation de la perte urinaire du complexe IGF-IGFBP (Lee *et al.*, 1996). Une autre possibilité qui pourrait expliquer la différence entre nos résultats et ceux de la littérature est la spécificité du test ELISA réalisé. Aucune interférence ou réactivité n'a été détectée par la compagnie lorsque l'ELISA pour IGFBP2 a été testé avec des échantillons contenant la protéine IGF-1, IGF-2

et IGFBP6 de souris ou encore avec un IGFBP2 humain. Sachant que les IGFBPs les plus présents dans la circulation sont IGFBP3 et IGFBP5, il est possible que le test puisse réagir avec ces protéines dans nos souris et ainsi expliquer l'absence d'augmentation des niveaux circulants d'IGFBP2 chez les souris diabétiques (Clemmons, 2018). Il est évident que d'autres expérimentations seront nécessaires afin d'expliquer ces résultats dans nos souris.

Une surexpression ou une délétion d'IGFBP2 ne semble pas pouvoir empêcher l'apparition et la progression de marqueurs pathologiques. Dans certains cas, une surexpression de la protéine semble plus bénéfique pour la souris, comme pour la pression artérielle moyenne, alors que d'autres résultats semblent montrer un effet plus bénéfique d'une délétion d'IGFBP2, notamment sur la glycémie, la filtration rénale et l'hypertrophie mésangiale.

### **Régulation et signalisation de l'IGF/IGFBP2**

La signalisation de l'IGF est connue et étudiée depuis longtemps par la communauté scientifique. Le foie étant la principale source d'IGF, la GH permet de produire l'hormone et de participer au développement normal du corps. Au niveau du glomérule, la voie de l'IGF a déjà été étudiée précédemment. Les premières études se sont concentrées sur les cellules mésangiales et ont démontré que ces cellules produisent de l'IGF-1 et de l'IGF1R et que cette signalisation pouvait être augmentée dans différentes pathologies comme le diabète (Hale *et al.*, 2013). Plus récemment, l'importance de la voie de l'IGF dans les podocytes a été démontrée pour la survie et le développement glomérulaire. Nos travaux ont démontré qu'en cas de diabète, l'activation protéique d'IGFBP2, de p-IGF1R et de p-Akt étaient plus faibles que chez des souris NDM (Figure 18). En surexprimant IGFBP2, on observe une augmentation significative de la phosphorylation de la protéine Akt, alors qu'on ne voit pas cette augmentation de la phosphorylation pour le récepteur IGF1R, suggérant qu'IGFBP2 pourrait participer à la survie cellulaire via des actions indépendantes aux IGFs dans le glomérule. Ces mêmes résultats ont été observés dans des souris diabétiques avec une délétion d'IGFBP2, où p-Akt est augmenté autant dans les DM que dans les NDM.

Afin de mieux comprendre comment ces changements protéiques surviennent dans les glomérules, différentes isoformes d'IGFBPs ont été évaluées par qPCR dans les glomérules

des souris. Puisque tous les IGFBPs sont exprimés dans le glomérule et peuvent lier les IGFs et impacter leur signalisation, il est important de comprendre comment ces protéines peuvent interagir dans le rein. La figure 19 montre l'expression de quatre isoformes d'IGFBPs et d'IGF1R- $\beta$  dans les glomérules, où IGFBP2 est augmenté dans les souris DM et encore plus augmenté chez les DM avec une surexpression. Une étude réalisée en 2010 par l'équipe de Fujinaka a obtenu les mêmes résultats chez le rat avec une insuffisance rénale, en mesurant les niveaux en ARNm d'IGFBP2 dans les glomérules ainsi que par hybridation *in situ* (Fujinaka *et al.*, 2010). Ces résultats suivent les résultats discutés plus haut, où plusieurs marqueurs pathologiques comme une hypertrophie glomérulaire et un effacement des pédicelles étaient présents dans les souris DM et les souris DM avec une surexpression d'IGFBP2. Les souris diabétiques ont également démontrés des niveaux élevés en ARNm pour IGFBP1 et IGFBP3, tous les deux connus pour être peu présents dans le glomérule en conditions normales (Fujinaka *et al.*, 2010). Dans le diabète de type 1, il est connu qu'une absence d'insuline augmente fortement les niveaux d'IGFBP1 dans le sang (Bereket *et al.*, 1995). Une étude réalisée au Danemark chez des enfants diabétiques de type 1 a démontré qu'il y avait une augmentation de la concentration d'IGFBP1 comparativement à un groupe d'enfants contrôles en sans problème de santé, allant ainsi dans le même sens que l'augmentation des niveaux d'IGFBP1 observés dans nos souris diabétiques (Sorensen *et al.*, 2015). Pour expliquer l'augmentation des niveaux d'IGFBP3 dans les glomérules chez les souris NDM avec une surexpression ou une délétion d'IGFBP2, il pourrait être intéressant en perspective d'étudier si la protéine KIM-1 pourrait influencer son expression. Au niveau du rein, l'IGFBP3 est produit en majorité par les cellules épithéliales des tubules proximaux, pareillement à KIM-1, et ces deux protéines se retrouvent augmentées chez les souris non-diabétiques avec une surexpression ou sans IGFBP2 au niveau du glomérule (Yoo *et al.*, 2011).

Les souris diabétiques Akita démontrent une augmentation des niveaux d'expression en ARNm d'IGFBP2 dans le glomérule qui est non significative, mais assez importante tout de même (Figure 20). Cette augmentation a aussi été observée dans le cortex rénal de souris diabétiques de type 1 et de type 2, suggérant un rôle de l'hyperglycémie dans l'augmentation d'IGFBP2. Étant donné la capacité de l'IGFBP2 à lier les IGFs et augmenter leur temps de



demi-vie, il est probable que les niveaux d'expression en ARNm soient augmentés chez les souris diabétiques afin de rétablir les voies de signalisation des IGFs dans les reins (Bach, 2018). L'expression d'IGFBP2 a été mesurée plus spécifiquement par qPCR *in vitro* dans des podocytes exposés à des concentrations normales ou élevées de glucose en présence ou non d'acides gras libres (Figure 21). Ces résultats ont permis de confirmer que l'hyperglycémie ne vient pas diminuer les niveaux d'IGFBP2 au niveau des podocytes, alors que le palmitate vient réduire l'expression en ARNm de la protéine. Les podocytes étant la principale source d'IGFBP2 dans le rein, ces cellules ne représentent cependant qu'une petite fraction de toutes les cellules présentes dans le cortex rénal, ce qui pourrait expliquer pourquoi les niveaux d'IGFBP2 ne sont pas réduits chez les souris diabétiques de type 2 qui ont une dyslipidémie.

Puisqu'un de nos objectifs était de mieux caractériser l'expression d'IGFBP2 dans la signalisation de l'IGF dans les podocytes, des tests *in vitro* ont été réalisés. Nos résultats ont permis de constater que l'IGF-2 active bel et bien les voies PI3K/Akt et Ras-Raf-MEK-ERK1/2 dans les podocytes en conditions normales de glucose (Figure 22). Le palmitate réduit les niveaux d'activation de la protéine Akt, pareillement à d'autres études réalisées au sein du laboratoire (Denhez *et al.*, 2020), mais également de la protéine ERK1/2. Alors que le palmitate réduit fortement les niveaux d'IGFBP2 dans les podocytes, l'IGF-2 active encore les protéines Akt et ERK1/2 en présence d'acides gras libres avec seulement une légère baisse d'activation. Les acides gras libres sont connus pour inhiber les actions des IGFs via l'activation de la MAPK *c-Jun N-terminal kinase* (JNK) dans d'autres types cellulaires, comme les chondrocytes (Nazli *et al.*, 2017). Dans les podocytes, il est connu que l'inhibition de la protéine IRS-1, présente au niveau du IGF1R, est inhibée par sa phosphorylation en sérine 307 par les voies *mechanistic target of rapamycin complex 1* (mTORC1) et *inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit beta* (IKK $\beta$ ) (Denhez *et al.*, 2020). Cette étude a été réalisée sur la voie de l'insuline, qui peut se lier à son récepteur IR ou au récepteur hybride IGF1R-IR avec une faible affinité. Les IGFs ont la capacité de lier non seulement leur propre récepteur, mais également le récepteur IR et le récepteur hybride, pouvant potentiellement expliquer pourquoi la voie d'Akt est encore assez fortement exprimée en présence de palmitate.

Notre laboratoire a déjà montré à plusieurs reprises que l'hyperglycémie engendrait une résistance à l'insuline au niveau des podocytes, observable via une perte de la signalisation de l'insuline, telle que les voies d'Akt et ERK après une stimulation à l'insuline dans des podocytes traités en hyperglycémie (Drapeau et al., 2013). La même observation a été faite avec une stimulation à l'IGF-2 en hyperglycémie, où on observe une diminution légère de la phosphorylation des protéines Akt et ERK1/2. Il y aurait donc une résistance à l'IGF-2 dans les podocytes traités en hyperglycémie également.

Toujours dans l'optique de mieux comprendre l'impact d'IGFBP2 sur la signalisation cellulaire de l'IGF, un recombinant d'IGFBP2 a été utilisé (Figure 23). L'ajout du recombinant seul a permis d'augmenter la phosphorylation d'ERK1/2 dans les podocytes, mais n'a eu aucun impact sur Akt et IGF1R. Cette augmentation peut être causée par des actions IGF-indépendantes de la protéine IGFBP2. Il est connu que la protéine peut lier plusieurs types de récepteurs transmembranaires pour interagir avec d'autres protéines dans la cellule. Une stimulation à l'IGFBP2 dans des cellules gliales U87 montre que l'IGFBP2 augmente la phosphorylation d'ERK1/2 et que cette action est possible grâce à la liaison d'IGFBP2 à l'intégrine  $\beta 1$  (Han *et al.*, 2014). Une combinaison d'IGF-2 et d'IGFBP2 dans les podocytes cause les mêmes effets que le recombinant seul lorsqu'on stimule les podocytes durant une période de 5 minutes. Puisque le complexe IGF-IGFBP2 a été pré-incubé durant 30 minutes pour assurer une combinaison des deux, on peut considérer que la majorité des IGFs sont liés à l'IGFBP2 et ne peuvent donc pas activer le récepteur IGF1R $\beta$ , comme nous avons observé dans la figure 23C. Puisque les domaines de liaison à l'IGF de l'IGFBP2 se trouvent dans les régions N et C-terminales, il est possible que les autres domaines d'IGFBP2, tels que ses deux domaines de liaison à l'héparine et son domaine de liaison aux intégrines, puissent toujours interagir avec des récepteurs transmembranaires et avoir des effets indépendants de l'IGF et venir activer la phosphorylation d'ERK1/2. Cette explication reste une hypothèse qui nécessite d'autres expériences afin de mieux comprendre ce phénomène. En présence de palmitate, on réduit la phosphorylation d'Akt sauf en présence d'IGF-2, où les niveaux sont peu diminués comparativement aux podocytes sans palmitate. Le palmitate réduit l'activation d'ERK1/2 que ce soit avec IGF-2, IGFBP2 ou la combinaison

des 2 alors qu'on assiste à une augmentation accrue de la phosphorylation d'IGF1R $\beta$  avec le palmitate et l'IGF-2, comparativement à l'IGF-2 seul. Ces résultats vont dans le même sens que les résultats de qPCR dans les podocytes, où l'expression en ARNm d'IGFBP2 est diminuée en présence de palmitate, permettant aux IGFs de lier le récepteur. Puisqu'ils ont une demi-vie d'environ 10 minutes en circulation, ceux-ci ont le temps d'interagir avec le récepteur et l'activer.

## Perspectives

### *Effets de l'hyperglycémie dans les podocytes*

Les résultats obtenus jusqu'à présent ont permis de montrer une augmentation de l'expression en ARNm d'IGFBP2 dans les glomérules des souris DM comparativement aux NDM. On observe également une augmentation de l'ARNm dans le cortex rénal de souris diabétiques de type 1 et de type 2. En revanche, les expérimentations avec le plasma des souris ne montrent pas d'augmentation des niveaux circulants de la protéine chez la souris DM de type Akita. Grâce à des expérimentations dans des podocytes *in vitro*, il serait intéressant de voir l'expression protéique d'IGFBP2 traités en conditions hyperglycémiques, sachant que les podocytes sont la source principale d'IGFBP2 dans le glomérule et que l'hyperglycémie semble changer l'expression en ARNm de la protéine dans le rein et les glomérules des souris. Bien que l'expression en ARNm d'IGFBP2 ne semble pas être modifiée dans les podocytes en hyperglycémie, l'expression protéique peut toutefois être différente et influencée par d'autres protéines au sein de la cellule.

L'hyperglycémie semble aussi augmenter la résistance à l'IGF-2 dans des podocytes en culture. Ces résultats n'étant malheureusement que préliminaires et non significatifs, il serait donc intéressant de confirmer si on assiste bel et bien à une résistance, pareillement à l'insuline, pour mieux comprendre l'importance de la voie de l'IGF dans la néphropathie diabétique. Des études antérieures dans notre laboratoire ont déjà démontré que l'apoptose des podocytes était augmentée chez les souris diabétiques (Lizotte *et al.*, 2016). Une trousse de détection d'apoptose *in situ* a été utilisée et a montré une fluorescence au niveau des cellules apoptotiques, où il a été possible de faire une colocalisation avec WT1, une protéine nucléaire spécifique aux podocytes, afin de confirmer l'augmentation de l'apoptose dans ces cellules. Il serait pertinent de localiser en incluant IGFBP2 et vérifier si on observe des

différences entre nos groupes de souris spécifiquement dans les podocytes. Cela permettrait de renforcer l'importance qu'un contrôle des niveaux d'IGFBP2 soit primordial dans l'apoptose des podocytes et le développement de la ND.

Dans notre projet, la microscopie électronique à transmission a permis de montrer un effacement des pédicelles dans les souris diabétiques ainsi que dans les souris avec une surexpression ou une délétion de IGFBP2. Des échantillons ont également été préparés afin de faire de la microscopie électronique à balayage, mais ces échantillons n'ont pas encore été analysés. Cela pourrait nous permettre de voir s'il y a une altération au niveau de la morphologie des podocytes, soit des modifications caractéristiques d'une dédifférenciation de ceux-ci, autant dans nos souris diabétiques que dans nos souris surexprimant IGFBP2 ou sans IGFBP2.

### ***Signalisation de l'IGFBP2***

Nos résultats ont montré qu'IGFBP2 peut avoir des effets indépendants aux IGFs dans les podocytes, notamment en activant la voie de signalisation de ERK1/2 sans stimulation à l'IGF-2. Il pourrait être intéressant d'étudier l'activation des différents récepteurs membranaires connus pour être activés par les IGFBPs afin de mieux comprendre la signalisation engendrée par cette liaison et son importance dans les podocytes. Il pourrait être pertinent de réaliser des immunoprécipitations avec les intégrines  $\alpha V\beta 3$ ,  $\alpha 5\beta 1$  ou avec le récepteur RPTP $\beta$  et voir s'il y a une forte interaction avec IGFBP2 par immunobuvardage. Également, une mesure des niveaux d'expression des autres isoformes d'IGFBPs pourrait être intéressante afin de constater des changements potentiels dans leur expression en conditions hyperglycémiques, avec ou sans palmitate et avec une stimulation à l'IGF-2 pour voir si un effet se produit entre les isoformes lorsqu'un IGFBP2 recombinant est présent en grande quantité dans les podocytes en culture.

Également, la signalisation de l'IGFBP2 pourrait être étudiée dans un modèle cellulaire différent, comme les tubules rénaux. Ceux-ci composent la majorité du cortex rénal et sont nécessaires à la bonne réabsorption et au bon fonctionnement du rein. Des résultats préliminaires réalisés dans notre laboratoire a montré que des souris non-diabétiques nourries avec une diète riche en adénine, connue pour causer une fibrose tubulaire, semblent exprimés environ 40 fois plus l'ARNm d'IGFBP2 et 2 fois plus l'ARNm d'IGFBP5 que des souris

contrôles dans les tubules. Ces résultats sont assez étonnants et représentent une bonne piste de recherche pour un projet futur au sein du laboratoire.

### ***Modèle murin de diabète de type 2 avec une surexpression ou une délétion d'IGFBP2***

Les souris Akita nous ont permis d'étudier l'impact d'une surexpression ou d'une délétion d'IGFBP2 dans un modèle de diabète de type 1. Les résultats préliminaires de notre collaborateur montrent qu'une diminution d'environ 33% des niveaux circulants d'IGFBP2 est observée chez des adolescents obèses souffrant de diabète de type 2. Plusieurs études cliniques ont déjà montré que des niveaux circulants élevés d'IGFBP2 étaient associés avec un risque réduit de développer le diabète de type 2 (Wittenbecher *et al.*, 2019). Des résultats préliminaires réalisés dans le laboratoire et non présentés dans ce mémoire montrent que les niveaux circulants d'IGFBP2 sont également diminués dans un modèle de souris db/db, un modèle de diabète de type 2. Également, nos résultats dans les podocytes *in vitro* ont montré que le palmitate, présent en grande quantité dans un diabète de type 2, affecte la signalisation de l'IGF et de l'IGFBP2 dans les podocytes. Il serait donc intéressant dans un projet futur d'étudier un modèle de souris db/db avec une surexpression ou une délétion de la protéine IGFBP2 afin d'observer la progression de la ND.

### **Conclusion**

Pour conclure, les résultats de notre étude ont permis de mieux caractériser le rôle de la protéine IGFBP2 dans la dysfonction podocytaire et le développement de la néphropathie diabétique. Dans les podocytes en culture, les niveaux en ARNm d'IGFBP2 sont réduits en présence d'acides gras libres comme le palmitate, alors qu'une stimulation à l'IGF-2 permet la phosphorylation d'Akt, ERK1/2 et IGF1R $\beta$ . L'IGFBP2 seul semble également augmenter la phosphorylation d'ERK1/2 alors qu'un traitement au palmitate empêche cette activation. De façon intéressante, une stimulation à l'IGF-2 en présence de palmitate n'empêche pas la phosphorylation d'Akt et augmente même l'activation du récepteur IGF1R $\beta$  de façon significative dans les cellules. Dans nos souris diabétiques Akita surexprimant IGFBP2, nous avons observé une pression artérielle moyenne diminuée, une aire mésangiale plus faible, une augmentation des niveaux plasmatiques et glomérulaires d'IGFBP2 ainsi qu'une activation de p-Akt plus importante que chez nos souris diabétiques. Les souris diabétiques

avec une délétion d'IGFBP2 présentent un poids et une production de p-Akt plus élevés et des aires glomérulaires, des aires mésangiales, une albuminurie et un GFR plus faibles que nos souris diabétiques. Ces données suggèrent qu'un excès ou une perte totale d'IGFBP2 semblent avoir des effets positifs et négatifs sur le développement de la néphropathie diabétique. D'un côté, une surexpression d'IGFBP2 permet de lier l'IGF et de prolonger son temps de demi-vie, augmentant ainsi les chances pour l'IGF de se rendre près de son récepteur, mais rendant les deux protéines incapables d'interagir entre elles. D'un autre côté, une absence d'IGFBP2 semble avoir des effets bénéfiques sur la signalisation de l'IGF, puisque celui-ci ne serait pas lié à l'IGFBP2 et pourrait donc lier efficacement son récepteur pour participer à la croissance et la survie cellulaire, mais possède un temps de demi-vie très court. Ensemble, ces résultats suggèrent qu'un bon contrôle de l'expression de cette protéine pourrait aider à réduire le développement de la ND. Cette étude permet de renforcer l'hypothèse des voies de signalisation régulant les signaux de survies comme le VEGF, l'insuline, la néphrine et l'IGF comme acteurs majeurs dans la fonction biologique des podocytes.

## LISTE DES RÉFÉRENCES

- Almomani, E., Kaur, S., Alexander, R. et Cordat, E. (2014). Intercalated Cells: More than pH Regulation. *Diseases* **2**(2): 71-92.
- Altaf, Q.A., Barnett, A.H. et Tahrani, A.A. (2015). "Novel therapeutics for type 2 diabetes: insulin resistance." *Diabetes Obes Metab* **17**(4): 319-334.
- Anik, A., Catli, G., Abaci, A. et Bober, E. (2015). "Maturity-onset diabetes of the young (MODY): an update." *J Pediatr Endocrinol Metab* **28**(3-4): 251-263.
- Avery, R.L., Pearlman, J., Pieramici, D.J., Rabena, M.D., Castellarin, A.A., Nasir, M.a.A., Giust, M.J., Wendel, R. et Patel, A. (2006). Intravitreal bevacizumab (Avastin) in the treatment of proliferative diabetic retinopathy. *Ophthalmology* **113**(10): 16950-16915.
- Aviv, Y. et Kirshenbaum, L.A. (2010). Novel phosphatase PHLPP-1 regulates mitochondrial Akt activity and cardiac cell survival. *Circ Res* **107**(4): 448-450.
- Bach LA. (2018). IGF-binding proteins. *Journal of Molecular Endocrinology*. **61**(1):T11-T28.
- Bach LA, Hale LJ. (2015) Insulin-like growth factors and kidney disease. *Am J Kidney Dis*. **65**(2):327-36.
- Baz, B., Riveline, J.P. et Gautier, J.F. (2016). "ENDOCRINOLOGY OF PREGNANCY: Gestational diabetes mellitus: definition, aetiological and clinical aspects." *Eur J Endocrinol* **174**(2): R43-51.
- Beauchamp, G. et Haller, M.J. (2015). "Can we prevent type 1 diabetes?" *Curr Diab Rep* **15**(11): 86.
- Beckman, J.A., Creager, M.A. et Libby, P. (2002). Diabetes and atherosclerosis: epidemiology, pathophysiology, and management. *JAMA* **287**(19): 2570-2581.
- Bereket A, Lang CH, Blethen SL, Gelato MC, Fan J, Frost RA & Wilson TA (1995) Effect of insulin on the insulin-like growth factor system in children with new-onset insulin dependent diabetes mellitus. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **80** :1312–1317.
- Berman, S., Abu Hamad, R. et Efrati, S. (2013). Mesangial cells are responsible for orchestrating the renal podocytes injury in the context of malignant hypertension. *Nephrology (Carlton, Vic.)* **18**(4): 292-298.

Booth, G.L., Kapral, M.K., Fung, K. et Tu, J.V. (2006). "Relation between age and cardiovascular disease in men and women with diabetes compared with non-diabetic people: a population-based retrospective cohort study." *Lancet* **368**(9529): 29-36.

Bridgewater DJ et Matsell DG. Insulin-like growth factor binding protein-2 modulates podocyte mitogenesis. (2003) *Pediatric Nephrology*. **18**(11):1109-15.

Canadian Diabetes Association Clinical Practice Guidelines Expert Committee, Wherrett, D., Huot, C., Mitchell, B. et Pacaud, D. (2013). "Type 1 diabetes in children and adolescents." *Canadian journal of diabetes* **37** Suppl 1: 62.

Cardoso VG, Gonçalves GL, Costa-Pessoa JM, Thieme K, Lins BB, Casare FAM, de Ponte MC, Camara NOS, Oliveira-Souza M. (2018). Angiotensin II-induced podocyte apoptosis is mediated by endoplasmic reticulum stress/PKC- $\delta$ /p38 MAPK pathway activation and trough increased Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger isoform 1 activity. *BMC Nephrol*. **19**(1):179.

Chertow GM, de Zeeuw D; BEACON Steering Committee. (2014). Bardoxolone methyl in type 2 diabetes and advanced chronic kidney disease. *N Engl J Med*. **370**(18):1768.

Cheung N, Mitchell P, Wong TY. (2010). "Diabetic retinopathy." *Lancet*. **376**(9735):124-36.

Clemmons DR. (2018). Role of IGF-binding proteins in regulating IGF responses to changes in metabolism. *J Mol Endocrinol*. **61**(1): T139-T169.

Criqui, M.H. (2001). "Peripheral arterial disease--epidemiological aspects." *Vasc Med* **6**(3 Suppl): 3-7.

Criqui MH, Aboyans V. (2015) Epidemiology of peripheral artery disease. *Circulation Research*. **116**(9):1509-26.

Cui FQ, Wang YF, Gao YB, Meng Y, Cai Z, Shen C, Liu ZQ, Jiang XC, Zhao WJ. (2019). Effects of BSF on Podocyte Apoptosis via Regulating the ROS-Mediated PI3K/AKT Pathway in DN. *J Diabetes Res*. **2019**:9512406.

DeFronzo, R.A. (2010). "Insulin resistance, lipotoxicity, type 2 diabetes and atherosclerosis: the missing links. The Claude Bernard Lecture 2009." *Diabetologia* **53**(7): 1270-1287.

DeMers D, Wachs D. (2020). Physiology, Mean Arterial Pressure. StatPearls Publishing.

Denhez, B., Lizotte, F., Guimond, M.-O.O., Jones, N., Takano, T. et Geraldès, P. (2015). Increased SHP-1 protein expression by high glucose levels reduces nephrin phosphorylation in podocytes. *The Journal of biological chemistry* **290**(1): 350-358.



Denhez B, Rousseau M, Dancosst DA, Lizotte F, Guay A, Auger-Messier M, Côté AM, Geraldès P. (2019). Diabetes-Induced DUSP4 Reduction Promotes Podocyte Dysfunction and Progression of Diabetic Nephropathy. *Diabetes*. **68**(5):1026-1039.

Denhez B, Rousseau M, Spino C, Dancosst DA, Dumas MÈ, Guay A, Lizotte F, Geraldès P. (2020). Saturated fatty acids induce insulin resistance in podocytes through inhibition of IRS1 via activation of both IKK $\beta$  and mTORC1. **10**(1):21628.

Diabetes Canada Clinical Practice Guidelines Expert Committee. Diabetes Canada 2018 Clinical Practice Guidelines for the Prevention and Management of Diabetes in Canada. *Can J Diabetes*. **42**(Suppl 1):S1-S325.

Dimitriadis, G., Mitrou, P., Lambadiari, V., Maratou, E. et Raptis, S.A. (2011). Insulin effects in muscle and adipose tissue. *Diabetes research and clinical practice* **93** Suppl 1: 9.

Drapeau, N., Lizotte, F., Denhez, B., Guay, A., Kennedy, C.R. et Geraldès, P. (2013). Expression of SHP-1 induced by hyperglycemia prevents insulin actions in podocytes. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* **304**(11): 98.

Dronavalli, S., Duka, I. et Bakris, G.L. (2008). The pathogenesis of diabetic nephropathy. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* **4**(8): 444-452.

Eremina, V., Jefferson, J.A., Kowalewska, J., Hochster, H., Haas, M., Weisstuch, J., Richardson, C., Kopp, J.B., Kabir, M.G., Backx, P.H., Gerber, H.P., Ferrara, N., Barisoni, L., Alpers, C.E. et Quaggin, S.E. (2008). VEGF inhibition and renal thrombotic microangiopathy. *N Engl J Med* **358**(11): 1129-1136.

Feldman EL, Callaghan BC, Pop-Busui R, Zochodne DW, Wright DE, Bennett DL, Bril V, Russell JW, Viswanathan V. (2019) Diabetic neuropathy. *Nature Reviews : Disease Primers*. **5**(1):41.

Fenske, R. J., & Kimple, M. E. (2018). Targeting dysfunctional beta-cell signaling for the potential treatment of type 1 diabetes mellitus. *Experimental biology and medicine*, **243**(6) : 586-591.

Fong, D.S., Aiello, L., Gardner, T.W., King, G.L., Blankenship, G., Cavallerano, J.D., Ferris, F.L. et Klein, R. (2003). Diabetic Retinopathy. *Diabetes Care* **26**(Supplement 1): S99-S102.

Foulstone EJ, Zeng L, Perks CM, Holly JM. (2013). Insulin-like growth factor binding protein 2 (IGFBP-2) promotes growth and survival of breast epithelial cells: novel regulation of the estrogen receptor. *Endocrinology*. **154**(5):1780–93.

Fujinaka H, Katsuyama K, Yamamoto K, Nameta M, Yoshida Y, Yaoita E, Tomizawa S, Yamamoto T. (2010) Expression and localization of insulin-like growth factor binding proteins in normal and proteinuric kidney glomeruli. *Nephrology*, **15**(7):700-9.

- Garg P. (2019) A Review of Podocyte Biology. *American Journal of Nephrology*. **47** Suppl 1:3-13.
- Geraldes, P. et King, G.L. (2010). Activation of protein kinase C isoforms and its impact on diabetic complications. *Circ Res* **106**(8): 1319-1331.
- Grahammer, F., Schell, C. & Huber, T. (2013) The podocyte slit diaphragm—from a thin grey line to a complex signalling hub. *Nature Reviews Nephrology* **9**, 587–598
- Greka, A. et Mundel, P. (2011). Cell biology and pathology of podocytes. *Annual review of physiology* **74**: 299-323.
- Grill V. (2019). LADA: A Type of Diabetes in its Own Right? *Current Diabetes Review*. **15**(3):174-177.
- Gupta, N., Mansoor, S., Sharma, A., Sapkal, A., Sheth, J., Falatoonzadeh, P., Kuppermann, B. et Kenney, M. (2012). "Diabetic retinopathy and VEGF." *The open ophthalmology journal* **7**: 4-10.
- Gurley SB, Mach CL, Stegbauer J, Yang J, Snow KP, Hu A, Meyer TW, Coffman TM. (2006). Influence of genetic background on albuminuria and kidney injury in Ins2(+/-C96Y) (Akita) mice. *Am J Physiol Renal Physiol*. **298**(3):F788-95.
- Haraldsson, B., Nyström, J. et Deen, W.M. (2008). "Properties of the Glomerular Barrier and Mechanisms of Proteinuria." *Physiological Reviews* **88**(2): 451-487.
- Hale LJ, Welsh GI, Perks CM, Hurcombe JA, Moore S, Hers I, Saleem MA, Mathieson PW, Murphy AJ, Jeansson M, Holly JM, Hardouin SN, Coward RJ. (2013). Insulin-like growth factor-II is produced by, signals to and is an important survival factor for the mature podocyte in man and mouse. *J Pathol*. **230**(1):95-106.
- Han S, Li Z, Master LM, Master ZW, Wu A. (2014). Exogenous IGFBP-2 promotes proliferation, invasion, and chemoresistance to temozolomide in glioma cells via the integrin  $\beta$ 1-ERK pathway. *Br J Cancer*. **111**(7):1400-9.
- Haywood NJ, Slater TA, Matthews CJ, Wheatcroft SB. (2018). The insulin like growth factor and binding protein family: Novel therapeutic targets in obesity & diabetes. *Mol Metab*. **19**:86-96.
- Hedbacker K, Birsoy K, Wysocki RW, Asilmaz E, Ahima RS, Farooqi IS, Friedman JM. (2010). Antidiabetic effects of IGFBP2, a leptin-regulated gene. *Cell Metabolism*. **11**(1):11-22.
- Henning RJ. (2018). Type-2 diabetes mellitus and cardiovascular disease. *Future Cardiology*. **14**(6):491-509.

Hise MK, Li L, Mantzouris N, Rohan RM. (1995). Differential mRNA expression of insulin-like growth factor system during renal injury and hypertrophy. *Am J Physiol* **269**:F817–F824

Hoffmann, S., Podlich, D., Hähnel, B., Kriz, W. et Gretz, N. (2004). Angiotensin II type 1 receptor overexpression in podocytes induces glomerulosclerosis in transgenic rats. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* **15**(6): 1475-1487.

Jahromi, M.M. et Eisenbarth, G.S. (2007). Cellular and molecular pathogenesis of type 1A diabetes. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **64**(7-8): 865-872.

Jat, P.S., Noble, M.D., Ataliotis, P., Tanaka, Y., Yannoutsos, N., Larsen, L. et Kioussis, D. (1991). Direct derivation of conditionally immortal cell lines from an H-2Kb-tsA58 transgenic mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**(12): 5096-5100.

Jefferson, J.A., Alpers, C.E. et Shankland, S.J. (2011). Podocyte biology for the bedside. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation* **58**(5): 835-845.

Johnson, J.A., Pohar, S.L. et Majumdar, S.R. (2006). Health care use and costs in the decade after identification of type 1 and type 2 diabetes: a population-based study. *Diabetes care* **29**(11): 2403-2408.

Jones, N., Blasutig, I.M., Eremina, V., Ruston, J.M., Bladt, F., Li, H., Huang, H., Larose, L., Li, S.S., Takano, T., Quaggin, S.E. et Pawson, T. (2006). Nck adaptor proteins link nephrin to the actin cytoskeleton of kidney podocytes. *Nature* **440**(7085): 818-823.

Kanjee R, Dookeran RI. (2016). Tele-ophthalmology for diabetic retinopathy in Canada-meeting the needs of a growing epidemic. *Canadian Journal of Ophthalmology*. **51**(3):133-4.

Kerjaschki, D., Vernillo, A.T. et Farquhar, M.G. (1985). "Reduced sialylation of podocalyxin--the major sialoprotein of the rat kidney glomerulus--in aminonucleoside nephrosis." *The American journal of pathology* **118**(3): 343-349.

Kolch, W. (2000). Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *The Biochemical journal* **351 Pt 2**: 289-305.

Kotajima, N., Kimura, T., Kanda, T., Obata, K., Kuwabara, A., Fukumura, Y. et Kobayashi, I. (1999). Type IV collagen as an early marker for diabetic nephropathy in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Journal of diabetes and its complications* **14**(1): 13-17.

Kunisaki, M., Bursell, S.E., Clermont, A.C., Ishii, H., Ballas, L.M., Jirousek, M.R., Umeda, F., Nawata, H. et King, G.L. (1995). Vitamin E prevents diabetes-induced abnormal retinal blood flow via the diacylglycerol-protein kinase C pathway. *The American journal of physiology* **269**(2 Pt 1): 46.

Laugesen, E., Ostergaard, J.A., Leslie, R.D., Danish Diabetes Academy, W. et Workshop, S. (2015). Latent autoimmune diabetes of the adult: current knowledge and uncertainty. *Diabet Med* **32**(7): 843-852.

Laviola L, Natalicchio A, Giorgino F. (2007). The IGF-I signaling pathway. *Curr Pharm Des.* **13**(7):663-9.

Lenkkeri, U., Männikkö, M., McCready, P., Lamerdin, J., Gribouval, O., Niaudet, P.M., Antignac C, K., Kashtan, C.E., Homberg, C., Olsen, A., Kestilä, M. et Tryggvason, K. (1998). Structure of the gene for congenital nephrotic syndrome of the finnish type (NPHS1) and characterization of mutations. *American journal of human genetics* **64**(1): 51-61.

Lewko, B. et Stepinski, J. (2009). Hyperglycemia and mechanical stress: targeting the renal podocyte. *Journal of cellular physiology* **221**(2): 288-295.

Liao, Y. et Hung, M.-C.C. (2009). Physiological regulation of Akt activity and stability. *American journal of translational research* **2**(1): 19-42.

Lin, Y. et Sun, Z. (2009). "Current views on type 2 diabetes." *Journal of Endocrinology.* **204**(1): 1-11.

Lizotte F, Denhez B, Guay A, Gévy N, Côté AM, Geraldès P. (2016) Persistent Insulin Resistance in Podocytes Caused by Epigenetic Changes of SHP-1 in Diabetes. *Diabetes.* **65**(12):3705-3717.

Luppi, P., Kallas, Å. et Wahren, J. (2013). Can C-peptide mediated anti-inflammatory effects retard the development of microvascular complications of type 1 diabetes? *Diabetes/metabolism research and reviews* **29**(5): 357-362.

Mack LR, Tomich PG. (2017). Gestational Diabetes: Diagnosis, Classification, and Clinical Care. *Obstetrics and Gynecology Clinics of North America.* **44**(2):207-217.

Malik S, Suchal K, Khan SI, Bhatia J, Kishore K, Dinda AK, Arya DS. (2019). Apigenin ameliorates streptozotocin-induced diabetic nephropathy in rats via MAPK-NF- $\kappa$ B-TNF- $\alpha$  and TGF- $\beta$ 1-MAPK-fibronectin pathways. *Am J Physiol Renal Physiol.* **313**(2):F414-F422.

Modi A, Agrawal A, Morgan F. (2017). Euglycemic Diabetic Ketoacidosis: A Review. *Current Diabetes Review.* **13**(3):315-321.

Nazli SA, Loeser RF, Chubinskaya S, Willey JS, Yammani RR. (2017). High fat-diet and saturated fatty acid palmitate inhibits IGF-1 function in chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage.* **25**(9):1516-1521.

Nielsen, S., Schmitz, A., Rehling, M. et Mogensen, C.E. (1997). "The clinical course of renal function in NIDDM patients with normo- and microalbuminuria." *Journal of Internal Medicine* **241**(2): 133-141.

Ning Y, Schuller AG, Bradshaw S, Rotwein P, Ludwig T, Frystyk J, Pintar JE. (2006). Diminished growth and enhanced glucose metabolism in triple knockout mice containing mutations of insulin-like growth factor binding protein-3, -4, and -5. *Mol Endocrinol.* **20**(9):2173-86.

Oh Y. (2011). The insulin-like growth factor system in chronic kidney disease: Pathophysiology and therapeutic opportunities. *Kidney Res Clin Pract.* **31**(1):26-37.

Osher E, Macaulay VM. (2019) Therapeutic Targeting of the IGF Axis. *Cells.* **8**(8):895.

Owen, K.R., Stride, A., Ellard, S. et Hattersley, A.T. (2003). Etiological investigation of diabetes in young adults presenting with apparent type 2 diabetes. *Diabetes Care* **26**(7): 2088-2093.

Papadopoulou-Marketou N, Chrousos GP, Kanaka-Gantenbein C. (2017). Diabetic nephropathy in type 1 diabetes: a review of early natural history, pathogenesis, and diagnosis. *Diabetes Metabolism Research and Reviews.* **33**(2).

Parwani K et Mandal P. (2020). Role of advanced glycation end products and insulin resistance in diabetic nephropathy. *Arch Physiol Biochem.* **30**:1-13

Patrakka, J., Kestilä, M., Wartiovaara, J., Ruotsalainen, V., Tissari, P., Lenkkeri, U., Männikkö, M., Visapää, I., Holmberg, C., Rapola, J., Tryggvason, K. et Jalanko, H. (2000). Congenital nephrotic syndrome (NPHS1): features resulting from different mutations in Finnish patients. *Kidney international* **58**(3): 972-980.

Pavenstädt, H. (1998). "The Charge for Going by Foot: Modifying the Surface of Podocytes." *Nephron Experimental Nephrology* **6**(2): 98-103.

Pereira JJ, Meyer T, Docherty SE, Reid HH, Marshall J, Thompson EW, *et al.* (2004) Bimolecular interaction of insulin-like growth factor (IGF) binding protein-2 with alphavbeta3 negatively modulates IGF-I-mediated migration and tumor growth. *Cancer Research.* **64**:977–84.

Plows JF, Stanley JL, Baker PN, Reynolds CM, Vickers MH. (2018). The Pathophysiology of Gestational Diabetes Mellitus. *International journal of molecular sciences* **19**(11): 3342.

Powell, D.W., Kenagy, D.N., Zheng, S., Coventry, S.C., Xu, J., Cai, L., Carlson, E.C. et Epstein, P.N. (2013). Associations between structural and functional changes to the kidney in diabetic humans and mice. *Life Sci* **93**(7): 257-264.

Quaggin, S.E. et Kreidberg, J.A. (2008). "Development of the renal glomerulus: good neighbors and good fences." *Development (Cambridge, England)* **135**(4): 609-620.

Raile, K., Galler, A., Hofer, S., Herbst, A., Dunstheimer, D., Busch, P. et Holl, R.W. (2007). "Diabetic nephropathy in 27,805 children, adolescents, and adults with type 1 diabetes: effect of diabetes duration, A1C, hypertension, dyslipidemia, diabetes onset, and sex." *Diabetes care* **30**(10): 2523-2528.

Rajpathak SN, He M, Sun Q, Kaplan RC, Muzumdar R, Rohan TE, Gunter MJ, Pollak M, Kim M, Pessin JE, Beasley J, Wylie-Rosett J, Hu FB, Strickler HD. (2012). Insulin-like growth factor axis and risk of type 2 diabetes in women. *Diabetes*. **61**(9):2248-54.

Riser, B.L., Varani, J., Cortes, P., Yee, J., Dame, M. et Sharba, A.K. (2001). Cyclic Stretching of Mesangial Cells Up-Regulates Intercellular Adhesion Molecule-1 and Leukocyte Adherence. *The American Journal of Pathology* **158**(1): 11-17.

Roscioni, S.S., Heerspink, H.J. et de Zeeuw, D. (2014). The effect of RAAS blockade on the progression of diabetic nephropathy. *Nature reviews. Nephrology* **10**(2): 77-87.

Ruotsalainen, V., Ljungberg, P., Wartiovaara, J., Lenkkeri, U., Kestilä, M., Jalanko, H., Holmberg, C. et Tryggvason, K. (1999). "Nephrin is specifically located at the slit diaphragm of glomerular podocytes." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**(14): 7962-7967.

Russo VC, Azar WJ, Yau SW, Sabin MA, Werther GA. (2015). IGFBP-2: The dark horse in metabolism and cancer. *Cytokine Growth Factor Reviews*. **26**(3):329-46.

Sabin MA, Russo VC, Azar WJ, Yau SW, Kiess W, Werther GA. (2011). IGFBP-2 at the interface of growth and metabolism--implications for childhood obesity. *Pediatric Endocrinology Reviews*. **8**(4):382-93.

Said, G. (2007). "Diabetic neuropathy—a review." *Nature Clinical Practice Neurology*. **3**, 331–340.

Satirapoj B. (2018). Tubulointerstitial Biomarkers for Diabetic Nephropathy. *J Diabetes Res*. **8**;2018:2852398.

Selvin, E. et Erlinger, T.P. (2004). "Prevalence of and risk factors for peripheral arterial disease in the United States: results from the National Health and Nutrition Examination Survey, 1999-2000." *Circulation* **110**(6): 738-743.

Sharma A, Purohit S, Sharma S, Bai S, Zhi W, Ponny SR, Hopkins D, Steed L, Bode B, Anderson SW, She JX. (2016). IGF-Binding Proteins in Type-1 Diabetes Are More Severely Altered in the Presence of Complications. *Front Endocrinol (Lausanne)*. **7**:2.

Sorensen JS, Birkebaek NH, Bjerre M, Pociot F, Kristensen K, Hoejberg AS, Frystyk J & Danish Society for Diabetes in Childhood and Adolescence (2015) Residual  $\beta$ -cell function and the insulin-like growth factor system in Danish children and adolescents with type 1 diabetes. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. **100** :1053–1061.

Stevenson, F, Datta, S. (1998). Organization of the kidneys. *Renal and Urinary Systems*. Elsevier Mosby : Philadelphia. (2<sup>nd</sup> ed), 16-17.

Thiruvoipati, T., Kielhorn, C.E. et Armstrong, E.J. (2015). "Peripheral artery disease in patients with diabetes: Epidemiology, mechanisms, and outcomes." *World J Diabetes* **6**(7): 961-969.

Thorens B. (2015). GLUT2, glucose sensing and glucose homeostasis. *Diabetologia*. **58**(2):221-32.

Tung CW, Hsu YC, Shih YH, Chang PJ, Lin CL. (2018). Glomerular mesangial cell and podocyte injuries in diabetic nephropathy. *Nephrology (Carlton)*. Suppl **4**:32-37.

Twine, C.P., Coulston, J., Shandall, A. et McLain, A.D. (2009). "Angioplasty versus stenting for superficial femoral artery lesions." *Cochrane Database Syst Rev*(2): CD006767.

Vasylyeva, T.L. et Ferry, R.J. Jr. (2007) Novel roles of the IGF-IGFBP axis in etiopathophysiology of diabetic nephropathy. *Diabetes Res Clin Pract*. **76**(2):177-86.

Vehik, K. et Dabelea, D. (2010). The changing epidemiology of type 1 diabetes: why is it going through the roof? *Diabetes/metabolism research and reviews* **27**(1): 3-13.

Verma, R., Kovari, I., Soofi, A., Nihalani, D., Patrie, K. et Holzman, L.B. (2006). Nephrin ectodomain engagement results in Src kinase activation, nephrin phosphorylation, Nck recruitment, and actin polymerization. *J Clin Invest* **116**(5): 1346-1359.

Veron, D., Bertuccio, C.A., Marlier, A., Reidy, K., Garcia, A.M., Jimenez, J., Velazquez, H., Kashgarian, M., Moeckel, G.W. et Tufro, A. (2011). Podocyte vascular endothelial growth factor (Vegf<sub>164</sub>) overexpression causes severe nodular glomerulosclerosis in a mouse model of type 1 diabetes. *Diabetologia* **54**(5): 1227-1241.

Wallace MA. (1998). Anatomy and physiology of the kidney. *AORN Journal*. **68**(5): 800, 803-16, 819-20.

Wang H, Misaki T, Taupin V, Eguchi A, Ghosh P, Farquhar MG. (2015). GIV/girdin links vascular endothelial growth factor signaling to Akt survival signaling in podocytes independent of nephrin. *J Am Soc Nephrol*. **26**(2):314-27.

Welsh, G.I., Hale, L.J., Eremina, V., Jeansson, M., Maezawa, Y., Lennon, R., Pons, D.A., Owen, R.J., Satchell, S.C., Miles, M.J., Caunt, C.J., McArdle, C.A., Pavenstädt, H., Tavaré, J.M., Herzenberg, A.M., Kahn, C.R., Mathieson, P.W., Quaggin, S.E., Saleem, M.A. et

Coward, R.J. (2010). "Insulin signaling to the glomerular podocyte is critical for normal kidney function." *Cell metabolism* **12**(4): 329-340.

Westley RL et May FE. (2013). A twenty-first century cancer epidemic caused by obesity: the involvement of insulin, diabetes, and insulin-like growth factors. *Int J Endocrinol.* 2013:632461.

Wheatcroft SB, Kearney MT, Shah AM, Ezzat VA, Miell JR, Modo M, Williams SC, Cawthorn WP, Medina-Gomez G, Vidal-Puig A, Sethi JK, Crossey PA. (2007). IGF-binding protein-2 protects against the development of obesity and insulin resistance. *Diabetes.* **56**(2):285-94.

Wittenbecher C, Ouni M, Kuxhaus O, Jähnert M, Gottmann P, Teichmann A, Meidtner K, Kriebel J, Grallert H, Pischon T, Boeing H, Schulze MB, Schürmann A. (2019). Insulin-Like Growth Factor Binding Protein 2 (IGFBP-2) and the Risk of Developing Type 2 Diabetes. *Diabetes.* **68**(1):188-197.

Yamamoto, T., Nakamura, T., Noble, N.A., Ruoslahti, E. et Border, W.A. (1993). Expression of transforming growth factor beta is elevated in human and experimental diabetic nephropathy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**(5): 1814-1818.

Yan-Ming, S., Ying, S., Jia, L. et Lan-Feng, W. (2013). Recent advances in understanding the biochemical and molecular mechanism of diabetic nephropathy. *Biochemical and biophysical research communications* **433**(4): 359-361.

Yoo EG, Lee WJ, Kim JH, Chae HW, Hyun SE, Kim DH, Kim HS, Oh Y. (2011). Insulin-like growth factor-binding protein-3 mediates high glucose-induced apoptosis by increasing oxidative stress in proximal tubular epithelial cells. *Endocrinology.* **152**(8):3135-42.

Yu, L., Lin, Q., Feng, J., Dong, X., Chen, W., Liu, Q. et Ye, J. (2013). Inhibition of nephrin activation by c-mip through Csk-Cbp-Fyn axis plays a critical role in Angiotensin II-induced podocyte damage. *Cellular signalling* **25**(3): 581-588.

Zeadin, M.G., Petlura, C.I. et Werstuck, G.H. (2013). "Molecular mechanisms linking diabetes to the accelerated development of atherosclerosis." *Can J Diabetes* **37**(5): 345-350.

Zhao S, Ghosh A, Lo CS, Chenier I, Scholey JW, Filep JG, Ingelfinger JR, Zhang SL, Chan JSD. (2018). Nrf2 Deficiency Upregulates Intrarenal Angiotensin-Converting Enzyme-2 and Angiotensin 1-7 Receptor Expression and Attenuates Hypertension and Nephropathy in Diabetic Mice. *Endocrinology*, **159**(2):836-852.

Zhao X, Chen Y, Tan X, Zhang L, Zhang H, Li Z, Liu S, Li R, Lin T, Liao R, Zhang Q, Dong W, Shi W, Liang X. (2018). Advanced glycation end-products suppress autophagic flux in podocytes by activating mammalian target of rapamycin and inhibiting nuclear translocation of transcription factor EB. *J Pathol.* **245**(2):235-248.



Zhao X, Zhang Y, Li L, Mann D, Imig JD, Emmett N, Gibbons G, Jin LM. (2011). Glomerular expression of kidney injury molecule-1 and podocytopenia in diabetic glomerulopathy. *Am J Nephrol.* **34**(3):268-80.